

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE MUTATIONS LÉTALES DANS LA RÉGION C-TERMINALE DE
LA PROTÉINE DBP4 CHEZ LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

SOUMAYA HACHANA

AOÛT 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier sincèrement Madame Sarah Jenna et Monsieur Eric Rassart, les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon projet de recherche de maîtrise.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur François Ouellet pour ses qualités humaines et scientifiques. Merci pour votre disponibilité, votre aide précieuse, vos prodigieux conseils et votre soutien dans cette démarche.

Merci à Monsieur François Dragon pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir encadrée.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin à finaliser mon projet de recherche.

Je remercie évidemment toute ma famille, qui m'a soutenue au cours de ces deux ans et tout au long de ma vie. Je ne te remercierai jamais assez Ihsen pour tout ce que tu fais pour moi, tu étais là pour moi au moment où ça n'allait pas et je t'en suis très reconnaissante.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ	viii
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Les ribosomes	2
1.1.1 Les ribosomes procaryotes	2
1.1.2 Les ribosomes eucaryotes	3
1.2 La biogenèse des ribosomes	5
1.3 Le nucléole	10
1.4 Les petits ARN nucléolaires et les ribonucléoprotéines	13
1.4.1 SnoARN U14	15
1.4.2 SnoARN U3	16
1.5 Les hélicases.....	17
1.6 Les protéines « DEAD-box ».....	19
1.7 La protéine « DEAD-box » Dbp4.....	25
1.8 L'étude présente.....	29
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
2.1 Création de la banque de mutants de Dbp4	31
2.2 Souche de levure et milieux	31
2.3 Déplétion des souches de levures de Dbp4	32
2.4 Criblage de la banque de clones Dbp4 mutés et identification des clones létaux	32
2.5 Analyse des protéines par SDS-PAGE et immunobuvardage de type western.	34
2.6 Bactéries et milieux	36

2.7	Extraction de l'ADN génomique de levure	37
2.8	Tests de co-immunoprécipitation	38
2.9	Microscopie par immunofluorescence	39
2.10	Technique de buvardage de type northern	40
CHAPITRE III		
	RÉSULTATS	43
3.1	Identification des mutants létaux de Dbp4	43
3.2	Position des mutations létales de Dbp4	46
3.3	Analyse de l'interaction entre Dbp4 et Bfr2 par co-immunoprécipitation.....	49
3.4	Localisation par immunofluorescence	49
3.5	Effet des mutations sur l'activité de Dbp4 dans la biogenèse des ribosomes par analyse de buvardage de type northern.....	52
CHAPITRE IV		
	DISCUSSION	53
4.1	Position des mutations létales de Dbp4	54
4.2	Interaction entre Dbp4 et Bfr2	57
4.3	Localisation sous-cellulaire des mutants de Dbp4.....	58
4.4	Effet des mutations sur l'activité de Dbp4 dans la biogenèse des ribosomes ..	60
CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE		64
RÉFÉRENCES		67

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure du ribosome eucaryote en 3D.....	4
1.2 Comparaison de la structure des ribosomes	6
1.3 Arbre de Noël ou arbre de Miller chez la levure	7
1.4 Synthèse et maturation des ARNr 18S, 5.8S et 25S chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.5 Structure et fonction du nucléole dans la biogenèse des ribosomes	11
1.6 Les snoARN et leurs ARN cibles	14
1.7 Structure secondaire d'U14 chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	15
1.8 Représentation schématique de l'interaction entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 18S chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	16
1.9 Les processus cellulaires impliquant les protéines « DEAD-box ».....	20
1.10 Présentation schématique des motifs conservés des protéines « DEAD- box ».....	21
1.11 Alignement de séquences des protéines « DEAD-BOX » DDX10 de l'humain et Dbp4 de la levure	26
1.12 Représentation schématique de la structure primaire de la protéine Dbp4 de la levure.....	27
1.13 Représentation schématique de la structure « coiled-coil ».....	28
2.1 Criblage de la banque de clones de Dbp4 chez la levure <i>S. cerevisiae</i> par transformation d'une banque de mutants de Dbp4 et identification des mutants létaux.....	33
3.1 Identification des clones létaux de pleine longueur de Dbp4 de la levure.....	44
3.2 Courbes de croissance de levures en milieu liquide contenant du dextrose	45
3.3 Position des mutations létales chez les clones de Dbp4 à simple mutation chez la levure.....	47
3.4 Position des mutations létales chez les clones de Dbp4 à multiples mutations de la levure	48

3.5	Analyse de l'interaction entre Dbp4 et Bfr2 dans la levure par co-immunoprécipitation	50
3.6	Immunolocalisation de Dbp4 fonctionnel et d'un mutant de Dbp4 chez la levure.....	51

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate (N = A, C, G ou T)
kDa	Kilodalton
pb	Paire de bases d'ADN
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
RNase	Ribonucléase
SD	"Synthetic drop out Dextrose"
SDS	"Sodium Dodecyl Sulfate"
SGal	"Synthetic drop out Galactose"
- Trp	Moins l'acide aminé Tryptophane
- Ura	Moins l'uracile
YPD	"Yeast extract Peptone Dextrose"
YPGal	"Yeast extract Peptone Galactose"

RÉSUMÉ

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Dbp4 est une ARN hélicase putative qui fait partie de la famille «DEAD-box». Cette enzyme nucléolaire est susceptible de jouer un rôle capital dans le processus de biogenèse des ribosomes puisqu'elle participe à la maturation de l'ARNr 18S, qui est requis pour la formation de la petite sous-unité 40S. Les protéines «DEAD-box» sont caractérisées par neuf motifs conservés formant le cœur catalytique de l'enzyme. Cette région est flanquée par des régions amino- et carboxy (C)-terminales. Le but de mon projet de recherche était d'identifier et caractériser des mutations au niveau de la région C-terminale de Dbp4 causant une létalité chez la levure. Pour ce faire, une technique de mutagenèse par "error-prone PCR" a été utilisée pour créer des mutations aléatoires dans cette région de Dbp4. Une banque de 60 000 clones a ainsi été générée dans notre laboratoire, que j'ai testée à l'aide d'un système génétique qui a permis d'identifier les mutants non fonctionnels. À ce jour, nous avons analysé près de 10000 clones. Nos résultats indiquent que 2% des clones contiennent des mutations létales. De ce nombre, 94 clones produisent une Dbp4 mutante de pleine longueur. Le séquençage des mutants de Dbp4 a dévoilé que les mutations sont réparties tout au long de la région C-terminale. Étant donné que les ARN hélicases jouent des rôles importants dans les processus nécessitant de gros complexes ARN-protéines, il est possible que Dbp4 agisse en association avec d'autres protéines. Comme la protéine nucléolaire Bfr2 présente une forte affinité pour Dbp4, nous avons vérifié par la technique de co-immunoprécipitation les interactions entre les mutants sélectionnés et Bfr2. Nos résultats confirment l'affinité entre Dbp4 et son partenaire protéique même en présence de mutations. Nous avons également montré par immunofluorescence qu'une mutation non fonctionnelle empêche la localisation nucléolaire de Dbp4. Il sera intéressant aussi d'examiner l'effet des mutations sur l'activité de Dbp4 dans la maturation de l'ARNr 18S par buvardage de type northern, ce qui nous aidera à mieux comprendre le rôle et la fonction de la protéine nucléolaire Dbp4 dans le processus à la fois captivant et sophistiqué de la biogenèse des ribosomes. Mon travail de recherche a été réalisé dans le but d'affiner notre compréhension des mécanismes d'assemblage des ARNr dans le processus de la biogenèse des ribosomes.

Mots clés: Dbp4, ARN hélicase, « coiled-coil », biogenèse des ribosomes.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

La cellule est l'unité structurale du monde vivant. L'activité des cellules est astreinte à l'influence des paramètres physico-chimiques du milieu dans lequel elles vivent. D'innombrables réactions chimiques définissent le métabolisme de ces cellules et chacune de ces réactions est catalysée par une enzyme spécifique. Ces enzymes sont principalement des protéines codées par des gènes. Des mutations au niveau de ces gènes peuvent causer une modification de l'information génétique entraînant ainsi une altération du fonctionnement des cellules. Toutes les cellules vivantes dépendent d'une synthèse des protéines efficace et adéquate. Cette synthèse se déroule au niveau des ribosomes, dont la biogenèse fait intervenir de nombreuses protéines pré-ribosomiques, des ARNr et d'innombrables facteurs d'assemblage. La prolifération cellulaire est profondément liée à la biogenèse des ribosomes, puisque ceux-ci sont impliqués dans les mécanismes de réplication, transcription et traduction. Chez la levure, ce processus à la fois dynamique et très ordonné implique plusieurs protéines dont des « DEAD-box » qui agissent à des étapes distinctes. La plupart de ces protéines sont extrêmement polyvalentes étant donné que leurs fonctions comprennent la modulation des complexes ARN-ARN et ARN-protéines, et/ou les interactions protéine-protéine. La caractérisation fonctionnelle des protéines « DEAD-box » à l'aide de mutations létales a permis d'éclaircir les mécanismes d'assemblage et de dissociation des facteurs pré-ribosomiques tout au long de la voie métabolique. Toutefois, plusieurs questions demeurent sans réponse notamment le déroulement des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le processus de la biogenèse des ribosomes ou encore le décodage précis des états successifs des deux sous-unités ribosomiques au cours de leur maturation.

1.1 Les ribosomes

Le processus de fabrication d'un ribosome unique est l'une des activités les plus métaboliquement dispendieuses au sein d'une cellule. Les ribosomes représentent les ensembles de macromolécules les plus importants de point de vue fonctionnel, et sont parmi les plus complexes ($\geq 3\text{MDa}$ chez les eucaryotes). Ce sont des structures de protéines et d'ARNr présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes, et qui jouent un rôle central dans la croissance cellulaire. Fonctionnellement, les ribosomes eucaryotes et procaryotes ne diffèrent pas de façon importante. Toutefois, les ribosomes chez les eucaryotes sont plus gros et plus complexes comparés aux procaryotes. Ceci est dû probablement à la complexité de la machinerie cellulaire chez les cellules eucaryotes, qui est responsable entre autres de l'initiation de la traduction, l'assemblage des ribosomes ou encore de la régulation de la synthèse des protéines.

1.1.1 Les ribosomes procaryotes

Les ribosomes procaryotes (bactéries et cyanophycée) sont libres dans le protoplasme. Ils sont composés d'une grande sous-unité 50S et d'une petite sous-unité 30S, et sont constitués d'un grand nombre de composantes. Chez *Escherichia coli*, on retrouve trois types d'ARNr et 53 protéines ribosomiques. Les ribosomes chez les procaryotes peuvent constituer jusqu'à 30% de la masse sèche de la cellule tandis que chez les eucaryotes ils ne représentent pas plus que 5% (Nierhaus, 1991). Chez les procaryotes, la petite sous-unité est composée d'un ARNr 16S et d'une vingtaine de protéines, alors que la grande sous-unité renferme les ARNr 5S et 23S mais aussi 30 protéines ribosomiques. Par ailleurs, la maturation du ribosome bactérien nécessite un nombre relativement restreint de facteurs non ribosomiques, tandis que chez les eucaryotes l'assemblage du ribosome nécessite environ 200

facteurs de maturation (Klinge et al., 2012). Au cours de l'initiation de la traduction chez les procaryotes, la sous-unité 30S, les ARNm ainsi que trois facteurs d'initiation (IF1, IF2 et IF3) forment un complexe d'initiation au niveau du site P. Ce dernier permet la fixation des ARNt. D'ailleurs tous les ribosomes contiennent trois sites de fixation d'ARNt. L'assemblage de la grande sous-unité conduit à la dissociation du facteur d'initiation IF1 et la formation du complexe 70S (Klinge et al., 2012).

1.1.2 Les ribosomes eucaryotes

Les ribosomes eucaryotes 80S sont 30% plus grands que leurs homologues bactériens et ont un poids moléculaire d'environ 30 MDa (levure). Ils sont libres dans la matrice cytoplasmique ou associés à la membrane du réticulum endoplasmique. En plus de ces ribosomes, les cellules eucaryotes possèdent des organites tels que les mitochondries et les chloroplastes qui contiennent des ribosomes 70S, probablement d'origine procaryote. L'assemblage du ribosome eucaryote nécessite plus de 200 facteurs de maturation (Klinge et al., 2012). L'initiation de la traduction nécessite quant à elle au moins neuf facteurs d'initiation (Klinge et al., 2012). Contrairement à leurs homologues bactériens, les ribosomes eucaryotes contiennent des ARNr supplémentaires sous forme de segments d'extension ainsi que de nombreuses protéines ribosomiques et des protéines d'extension (Wilson et Doudna Cate, 2012). Les deux ribosomes diffèrent également dans la répartition de ces segments d'extension (Hashem et al., 2013). Les cellules de levure produisent en phase exponentielle de croissance environ 200 000 ribosomes avec un temps de génération d'environ 90 minutes, ce qui correspond à une production de 2000 ribosomes par minute (Daugeron et al., 2001). Les ribosomes sont constitués d'environ 80 protéines et 4 ARNr: le 5S, le 5.8S, le 18S et le 25S. Le tout forme deux sous-unités de taille inégale et de forme différente : la petite sous-unité 40S et la grande sous-unité 60S (Figure 1.1). Ces deux sous-unités doivent s'assembler pour former un ribosome

fonctionnel. Il semble que la structure de la sous-unité 40S forme un complexe avec le facteur d'initiation eIF1, ce qui suggère que ce dernier pourrait être impliqué dans la numérisation de l'ARNm pendant l'initiation de la traduction. La sous-unité 40S permettrait donc de synthétiser les protéines en décodant l'information contenue dans les ARNm. La structure de la sous-unité 60S semble quant à elle être en complexe avec le facteur d'initiation eIF6 (Hashem et al., 2013). Une grande quantité de données expérimentales suggère que le facteur d'initiation eIF4A participe à la réorganisation de la structure du duplex ARN-ARN afin de le préparer à la formation de la petite sous-unité ribosomique (Rocak et Linder, 2004).

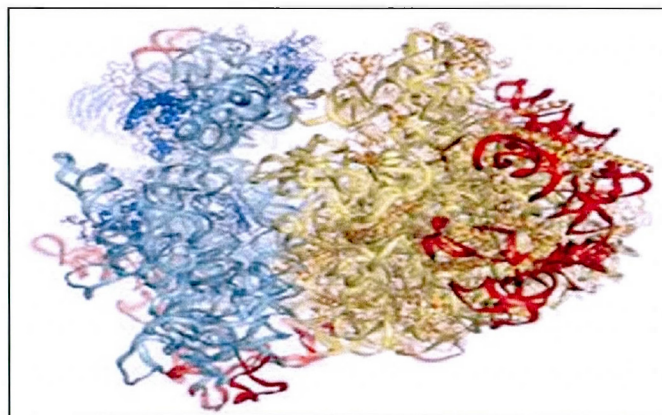


Figure 1.1 Structure du ribosome eucaryote en 3D

La petite sous-unité est représentée en bleu (appelée 40S), tandis que la grande sous-unité apparaît en jaune (appelée 60S). Chaque sous-unité est formée de nombreuses chaînes d'ARNr (bleu et jaune pâle) et de plusieurs protéines (bleu et jaune foncé). Les segments d'extension, qui constituent des segments d'ARN supplémentaire absents chez les procaryotes, sont indiqués en rouge. (Tirée de Ben-Shem et al., 2010)

Les analyses de cristallisation par rayons X ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle des ribosomes. Cette information a été cruciale pour mieux comprendre les données biochimiques et génétiques. L'interprétation de la structure cristalline des deux ribosomes procaryotes et eucaryotes à résolution atomique a confirmé la complexité du processus d'assemblage du ribosome (Ramakrishnan, 2002). La petite sous-unité du ribosome chez *E. coli* apparaît sous forme d'un «gant»,

tandis que la grande sous-unité présente une forme sphéroïde (Voet et Voet, 2004). Un modèle tridimensionnel du ribosome 80S chez la levure *S. cerevisiae* a été obtenu avec une résolution de 35 Å et il a révélé une remarquable similarité avec le ribosome 70S d'*E. coli*, et la principale différence est observée surtout au niveau de la forme de la petite sous-unité. Certes, le ribosome de *E. coli* présente des fonctions homologues à la levure mais il est moins gros et moins élaboré morphologiquement (Verschoor et al., 1998). Le ribosome de levure présente une structure bipartite qui peut s'avérer allongée en fonction de l'angle de vue (Figure 1.2). Les deux sous-unités du ribosome de levure sont présentées côte-à-côte, la sous-unité 40S est à gauche tandis que la sous-unité 60S se trouve à droite. Dans cette vue, la hauteur du ribosome est ~ 254 Å, la largeur est ~ 278 Å et l'épaisseur est ~ 267 Å. Comparées au ribosome d'un eucaryote supérieur, ces dimensions (hauteur et largeur) sont 11-14% plus petites mais ces dimensions sont par contre supérieures à celle d'un ribosome procaryote chez *E. coli*. La grande sous-unité 60S semble avoir une forme elliptique tandis que la forme de la sous-unité 50S est plutôt compact (Verschoor et al., 1998).

1.2 La biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes est un processus métabolique majeur chez tous les organismes. Bien que des progrès spectaculaires aient été réalisés dans le but de comprendre la synthèse des ribosomes, ce processus a été le mieux caractérisé chez la levure *S. cerevisiae*. La biogenèse des ribosomes a lieu dans le nucléole, nécessitant autour de 200 protéines et différents petits ARN nucléolaires (snoARNs) pour produire des ribosomes fonctionnels (Venema et Tollervey, 1999). La synthèse des ribosomes implique des interactions majeures entre le noyau et le cytoplasme. La régulation de cette synthèse est complexe, non seulement en raison du nombre de composants impliqués, mais aussi parce qu'elle est étroitement liée à la croissance cellulaire (Venema et Tollervey, 1999). L'assemblage des ribosomes *in vivo* nécessite

des dizaines de facteurs agissant en trans, comme les exo et endonuclease, les hélicases à ARN, les GTPases et les ARNr.

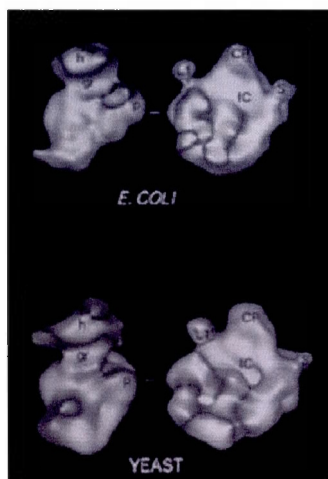


Figure 1.2 Comparaison de la structure des ribosomes

Le ribosome *E. coli* 70S et le ribosome de levure 80S sont présentés à une résolution de 35 Å. Vue de la petite et de la grande sous-unité du ribosome de levure et d'*E. coli* montrant les caractéristiques de surfaces de l'interface ribosomique. IC, canyon d'interface; CP, protubérance centrale; S, tige; L1 ou 'L1', bras analogue; h, tête; p, plateforme. (Tirée de Verschoor et al., 1998)

La purification biochimique de particules pré-ribosomiques par la méthode en TAP (Tandem Affinity Purification) et l'identification des protéines par spectrométrie de masse ont révélé un large éventail de facteurs intervenant dans la biogenèse des ribosomes (Phipps et al., 2011). Chez la levure, outre les ARNr, les protéines ribosomiques et les 75 petits ARN nucléolaires, plus de 250 protéines non-ribosomiques, généralement désignées comme facteurs agissant en trans, sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes. Ces facteurs comprennent des nucléases, ATPases, GTPases, des kinases et des hélicases à ARN. Il est probable que tous ces facteurs participent au processus de synthèse des ribosomes, cependant les fonctions précises pour la plupart d'entre eux sont encore largement inconnues (Rodriguez-Galan et al., 2013). Chez *S. cerevisiae*, la grande sous-unité ribosomique est composée de 46 protéines ribosomiques et trois ARNr (5S, 5.8S, et 25S) tandis que la

petite sous-unité ribosomique 40S contient 32 protéines ribosomiques et l'ARNr 18S. Chez la levure *S. cerevisiae*, la voie complexe de maturation des ARNr commence par la transcription de deux précurseurs: le pré-ARNr 35S et le pré-ARNr 7S. Le pré-ARNr 35S doit subir des clivages pour générer les différents ARNr matures, un processus qui nécessite une large ribonucléoprotéine surnommé SSU processome. Il s'agit d'un complexe de 2.2 MDa, contenant pas moins de 72 composants protéiques et impliqué dans le traitement, l'assemblage et la maturation des ribosomes eucaryotes (Phipps et al., 2011).

Des analyses des structures de chromatine nucléolaire par microscopie électronique (Figure 1.3) réalisées dans le but de caractériser le processus de la biogenèse des ribosomes chez la levure ont permis de caractériser de nouvelles structures intermédiaires associées à l'extrémité 5' du transcrit et à la séquence d'ARNr 18S. Il semble que ces intermédiaires d'ARNr peuvent être associés au complexe ribonucléique SSU processome (Gruenbaum et al., 2006).

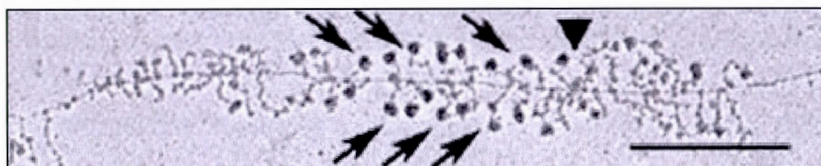


Figure 1.3 Arbre de Noël ou arbre de Miller chez la levure.

Le tronc représente l'ADNr et chaque branche constitue l'ARNr en cours de synthèse. Le pré-ARNr 35S (indiqué par les flèches) subit un clivage cotranscriptionnel en A2 dans l'ITS permettant la libération du pré-ribosome 40S. La pointe de flèche indique le SSU processome. (Tirée de Gruenbaum et al., 2006)

Le processus de maturation des ARNr 18S, 5.8S et 25S est représenté à la Figure 1.4. Le pré-ARNr 35S, synthétisé par l'ARN polymérase I, porte les séquences des trois ARNr flanquées par des espaceurs externes non codants ETS ("external-transcribed spacer") et sont divisées par des séquences internes non codantes ITS ("internal-

transcribed spacer"). Le précurseur est modifié de façon covalente par méthylation ou pseudouridylation sur de nombreux sites, puis soumis à un traitement par des endonucléases et exonucléases pour générer les ARNr matures 18S, 5.8S et 25S. Ces ARNr s'assemblent de façon indépendante avec l'ARNr 5S synthétisé par l'ARN polymérase III sous forme d'un précurseur 7S. Le 35S est clivé de manière très structurée aux sites A0 et A1 dans le 5'ETS et dans l'ITS1 au niveau du site A2. Le clivage au niveau des sites A0 et A1 donnent les pré-ARNr 32S et 33S tandis que le clivage au site A2 produit les précurseurs 20S et 27SA2. Les étapes de maturation finale, qui comprennent le clivage au site D, se produisent après que les particules soient exportées dans le cytoplasme où la maturation du 20S en 18S permet l'assemblage de la sous-unité 40S (Lemay et al, 2011).

Jusqu'à ce jour, environ 60 facteurs protéiques ont été décrits dans la biogenèse des ribosomes chez la levure. La plupart de ces facteurs ont été regroupés en fonction de leurs fonctions enzymatiques et / ou de leurs interactions avec des petits ARN nucléolaires (snoARN : "small nucléolar" ARN) et d'autres protéines. La majorité des facteurs protéiques et des ARN impliqués dans la biogenèse des ribosomes sont localisés au niveau du nucléole et sont essentiels pour la croissance. L'assemblage des différentes protéines ribosomiques en particules pré-ribosomiques a été principalement étudié par des analyses de contrôle de la cinétique d'incorporation de chaque protéine cytoplasmique et nucléaire dans les particules ribosomiques. Ces expériences indiquent qu'un grand nombre de protéines ribosomiques s'associent aux pré-ribosomes nucléolaires à des étapes précoces de la maturation des ribosomes (Phipps et al, 2011). D'autre part, il semble qu'une déplétion touchant des protéines ribosomiques peut conduire à une inhibition des premières réactions de clivage des pré-ARNr au niveau des sites A0, A1 et A2. Ce défaut de clivage résulte en une

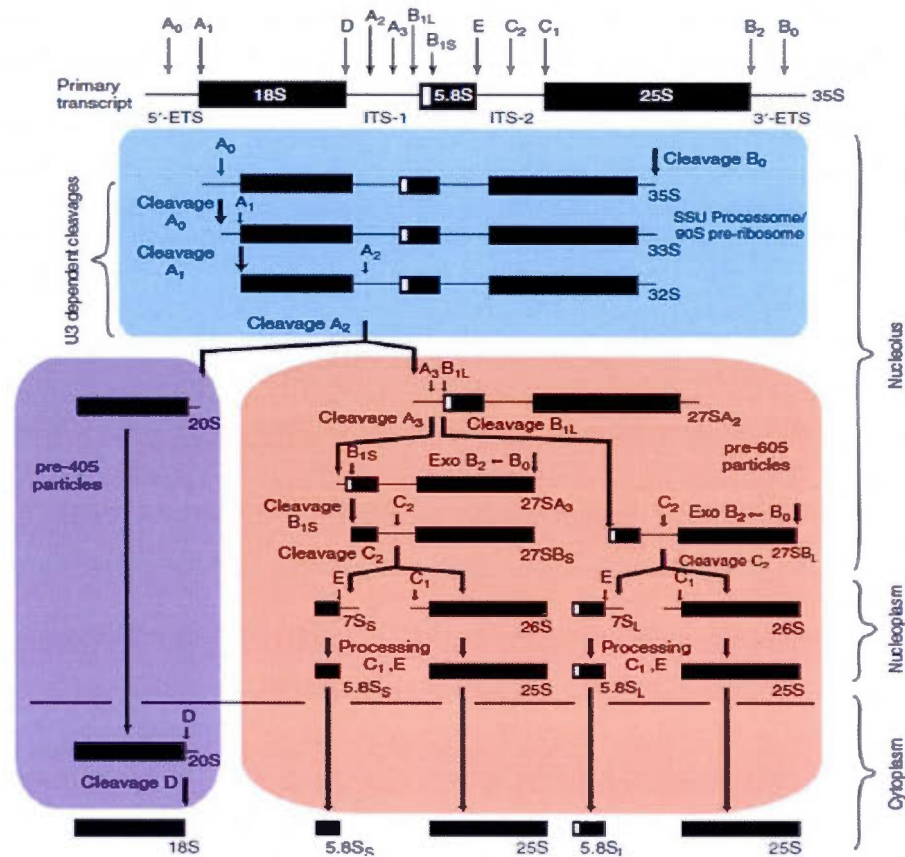


Figure 1.4 Synthèse et maturation des ARNr 18S, 5.8S et 25S chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Les barres épaisses représentent les régions se retrouvant dans les ARNr matures, les barres minces indiquent les séquences espaceurs : ETS ("external transcribed sequence") et ITS ("internal transcribed sequence"). Les séquences codantes pour les ARNr 18S, 5.8S, et 25S sont flanquées par les 5' et 3' ETS et sont séparées par les séquences ITS 1 et 2. Le précurseur 35S est clivé au site A0, donnant naissance au précurseur 33S, et ce dernier est rapidement clivé au site A1. Le précurseur 32S est clivé à son tour au site A2, permettant la formation des pré-ARNr 20S et 27SA2. Ces deux molécules sont respectivement les précurseurs des ARNr destinés à la petite et à la grande sous-unité ribosomique. Le précurseur 20S est clivé au niveau du site D, générant l'ARNr 18S mature. La majorité du précurseur 27SA2 est clivé au site A3 par la RNase MRP, ce qui donne le pré-ARNr 27SA3. Ce dernier génère les ARNr matures 5.8S et le 25S. (Tirée de Phipps et al., 2011)

réduction de la synthèse des ARNr et des sous-unités ribosomiques 40S et 60S (Kressler et al., 1999). En raison de l'importance de ce processus, des défauts dans la biogenèse des ribosomes peuvent avoir des effets néfastes sur le métabolisme cellulaire. Il s'avère que certaines pathologies sont associées à un défaut de synthèse

des ribosomes tel que l'anémie Blackfan-Diamond (ABD) qui est causée par la mutation d'un gène qui code pour une protéine ribosomique ou encore le syndrome de Shwachman-Diamond où une anomalie génétique touche un gène codant pour une protéine ribosomique qui se lie à un facteur d'élongation du ribosome (Chabane et Blangy, 2006).

1.3 Le nucléole

Le nucléole représente un compartiment sous-nucléaire distinct qui a été observé pour la première fois il y a plus de 200 ans. C'est au niveau du nucléole que se déroulent la transcription et la maturation des ARNr (Hernandez-Verdun, 2006). Le nucléole est aussi l'usine de fabrication des ribosomes (Figure 1.5). Il est considéré comme une structure dynamique puisqu'il apparaît pendant l'interphase et disparaît au cours de la mitose. Ce corpuscule à la fois sphérique et très dense est souvent décrit comme un compartiment spécialisé du noyau dans lequel les loci d'ADNr sont regroupés en plusieurs centaines de répétitions en tandem dans les régions nucléolaires organisatrices (NOR). Bien que la taille et la structure du nucléole varient selon le type cellulaire et le métabolisme, la morphologie ultrastructurale est très conservée chez les eucaryotes. Le nombre de nucléole est également variable: généralement on en observe un mais il arrive qu'il y en ait deux ou trois. Trois régions nucléolaires de base peuvent être distinguées par microscopie électronique : le centre fibrillaire (FC) qui contient des gènes inactifs d'ADNr, le composant fibrillaire dense (DFC), lieu de synthèse des pré-ARNr, et la composante granulaire, site de traitement et d'assemblage des particules ribosomiques (Phipps et al., 2011).

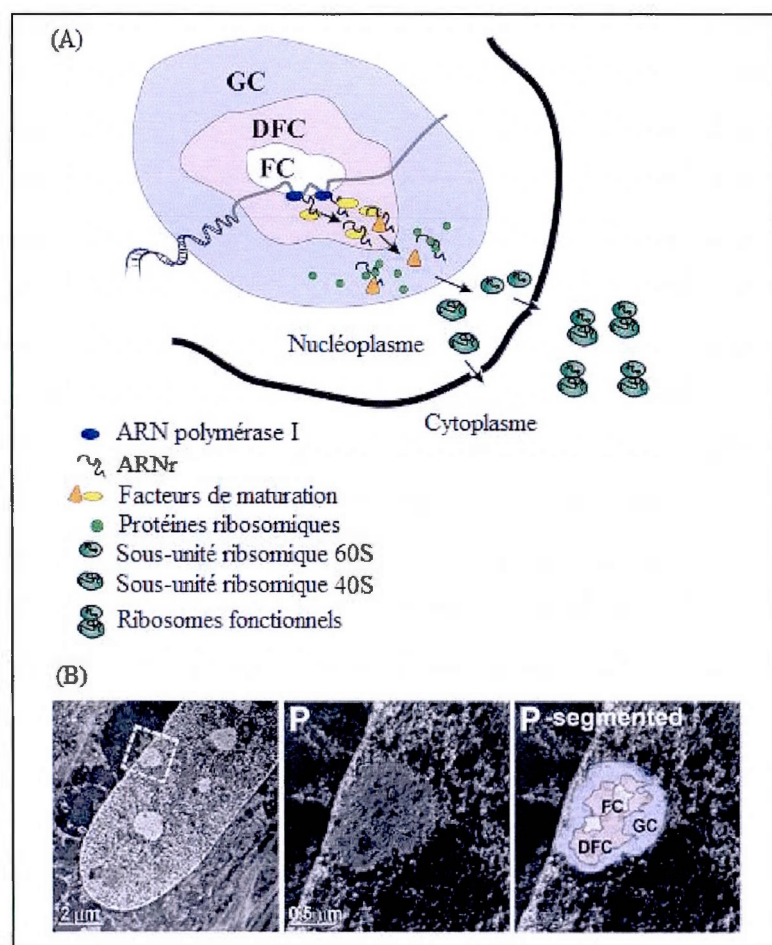


Figure 1.5 Structure et fonction du nucléole dans la biogenèse des ribosomes

(A) Régions du nucléole impliquées dans la biogenèse des ribosomes. La microscopie électronique a permis d'observer trois régions morphologiquement distinctes du nucléole. Le centre fibrillaire (FC) est entouré par le composant fibrillaire dense (DFC) qui est à son tour entouré par le composant granulaire (GC). L'ARN polymérase I qui est impliquée dans la transcription des gènes des ADNr, se trouve à l'interface des régions FC et DFC. Chaque transcrit nouvellement produit quitte la région DFC pour rejoindre le composant GC. Au cours de ce cheminement, le transcrit est clivé, mûré et associé aux protéines ribosomiques. Après les étapes de maturation, les sous-unités ribosomiques 40S et 60S sont exportées dans le cytoplasme pour former le ribosome final. (B) Analyse du nucléole par spectroscopie électronique. Dans l'image de gauche, on observe la région d'intérêt contenant le nucléole (encadré). L'image du centre correspond aux ARN et ADN visualisés. L'image de droite contient les régions FC, DFC et GC. (Tirée de Cann et Dellaire, 2010)

En microscopie électronique, on remarque la présence du nucléole dans le noyau par la forte densité des électrons due à la présence d'un grand nombre d'ARN. Dans le noyau, le nucléole est un corps dense, non délimité par une membrane. Il est parfois

différencié en deux zones : la zone fibrillaire centrale et la zone granulaire périphérique. Chez la levure, quand le processus de biogenèse des ribosomes est activé, le nucléole est composé des centres fibrillaires, qui sont des régions claires dont la taille varie de 0,1 à 1 μm . Celles-ci sont entourées par le composant fibrillaire ou zone granulaire. L'ensemble forme des granules de 15 à 20 nm (Hernandez-Verdun, 2006). La taille et l'organisation du nucléole sont directement liées à la production des ribosomes. L'organisation du nucléole révèle la compartimentation fonctionnelle des machineries nucléolaires qui dépendent justement de l'activité nucléolaire (Hernandez-Verdun, 2006). Des analyses protéomiques récentes réalisées par spectrométrie de masse sur des extraits nucléolaires ont permis d'identifier près de 700 protéines, parmi lesquelles certaines ne sont pas liées à la biogenèse des ribosomes. La présence de ces protéines confirme que le nucléole, en plus d'être le site de la biogenèse des ribosomes, est impliqué aussi dans d'autres fonctions cellulaires (Olson et al., 2000). L'implication du nucléole dans les machineries complexes des ARN et l'assemblage des ribonucléoprotéines (RNP) permettrait à d'autres RNP fonctionnelles, telles que la télomérase ou encore des RNP d'épissage, d'exploiter le nucléole dans leur voie de biogenèse (Boisvert et al., 2007).

Bien que le nucléole soit principalement associé à la biogenèse des ribosomes, plusieurs éléments de preuve montrent qu'il exerce des fonctions supplémentaires. Parmi ces fonctions, on note la régulation de la mitose ou encore la prolifération du cycle cellulaire. Des mutations des gènes codant pour des ADN hélicases ont associé le nucléole à certaines pathologies telles que l'anémie Diamond-Blackfan (Chabane et Blangy, 2006) qui résulte de mutations dans le gène qui code pour la protéine ribosomique RPS19. Cette anomalie affecte la maturation de l'ARNr 18S ainsi que la production de la sous-unité ribosomique 40S. Ces observations ont permis de conclure que l'altération des fonctions au niveau du nucléole pourrait mener à des anomalies phénotypiques (Boisvert et al., 2007). En dépit de plusieurs années de

recherche, le nucléole réserve probablement d'autres surprises que nous ignorons encore.

1.4 Les petits ARN nucléolaires et les ribonucléoprotéines

Les snoARN sont des ARN présents dans le nucléole des cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle capital dans le processus de maturation des ARNr et dans les modifications post-transcriptionnelles. Il existe un large éventail de populations de snoARN, probablement plus de 100 espèces différentes. La majorité des snoARN peut être classée en deux grandes familles, à l'exception d'une espèce soupçonnée d'être un ribozyme. Ces familles se distinguent par la présence d'éléments de séquences conservées, appelées boîte C/D et boîte ACA. Tous les snoARN à boîtes C/D présentent quatre éléments de séquences communes comprenant les boîtes C/D et les domaines A et B. Le domaine B n'est pas indispensable mais il devient conditionnellement essentiel lorsque l'interaction entre le domaine A et les ARNr est affaiblie (Liang et Fournier, 1995). Les snoARN de cette classe sont nécessaires à la méthylation des ARNr (Liang et al., 1997).

Les snoARN s'associent avec des protéines spécifiques pour former des ribonucléoprotéines (snoRNP). Ces petites ribonucléoprotéines nucléolaires assurent la méthylation et la pseudouridylation de l'ARN. Chaque classe des snoRNP C/D et H/ACA est définie par sa composante d'ARN (le snoARN). Des régions de séquences uniques des snoARN sont impliquées dans la formation des snoRNP matures. Ces éléments de séquences sont en grande partie conservés et sont essentiels pour l'assemblage des snoRNP fonctionnelles. La classe C/D des snoARN est définie par deux motifs consensus (Figure 1.6). La séquence UGAUGA de la boîte C se situe proche de l'extrémité 5' de l'ARN, tandis que la séquence CUGA de la boîte D se situe à l'extrémité 3'. Ces deux motifs sont réunis par un appariement de bases entre

les extrémités 5' et 3' de l'ARN (Reichow et al., 2007). La plupart des classes C/D des snoARN contiennent un second ensemble de séquences conservées, les boîtes C' et D', situées dans la région centrale de l'ARN. Chez les eucaryotes, ces éléments sont très peu conservés. Le site de modification est caractérisé par la formation de paires de bases entre une séquence de 10 à 20 nucléotides qui se trouvent en amont du motif D et / ou D' du snoARN et des séquences complémentaires flanquant le site de méthylation de l'ARN. La réaction de méthylation a lieu exactement à 5 nucléotides en amont du motif conservé CUGA (Reichow et al., 2007).

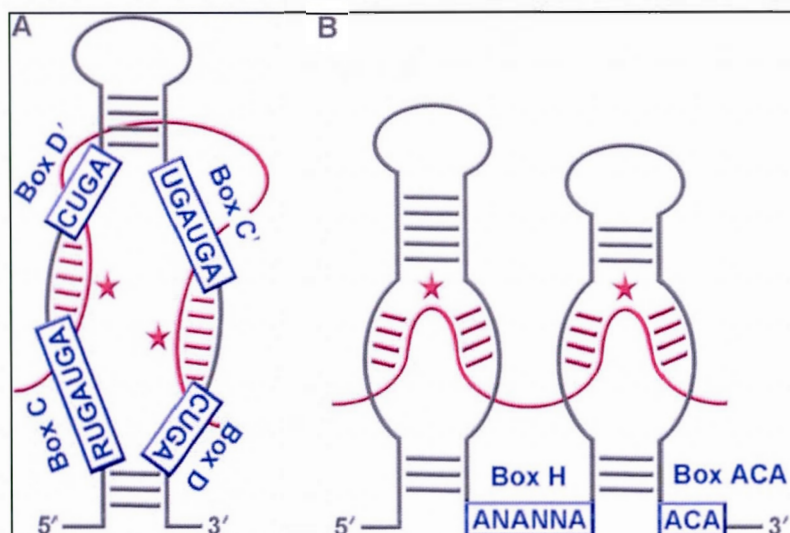


Figure 1.6 Les snoARN et leurs ARN cibles

Les classes C/D (A) et H/ACA (B) des snoARN (en gris) contiennent des «boîtes» qui sont des motifs de séquences conservées et spécifiques à chaque classe (en bleu). Les sites ciblés pour la modification des nucléotides sont marqués d'une étoile. Les snoARN H/ACA adoptent une structure secondaire commune sous forme de deux épingles. Les deux tiges-boucles sont reliées par une région charnière qui contient la séquence ANANNA (boîte H) et la deuxième épingle à cheveux est suivie d'un segment simple brin avec une séquence de trois nucléotides (boîte ACA) située exactement à trois nucléotides en amont de l'extrémité 3' du snoARN. (Tirée de (Reichow et al., 2007))

Dans le même ordre d'idées, des études ont mis en évidence le rôle d'une structure nucléaire dans la biogenèse des snoRNP. Cette structure de forme sphérique, connue sous le nom de corps de Cajal, est présente chez les vertébrés et les invertébrés. En

plus des snoRNP, le corps de Cajal renferme aussi de nombreux constituants nucléolaires tels que les snoARN. Il semble que le corps de Cajal puisse servir de site de maturation des snoARN et d'assemblage des snoRNP (Qiu et al., 2008).

1.4.1 SnoARN U14

Parmi les snoARN, on distingue U14, connu pour son rôle dans la méthylation du ribosome et sa participation à la maturation de l'ARNr 18S (Figure 1.7). Des études ont rapporté que la perte ou l'inactivation du snoARN U14 peut perturber les clivages spécifiques des pré-ARNr, ce qui va causer des niveaux réduits de l'ARNr mature 18S (Liang et al., 1997).

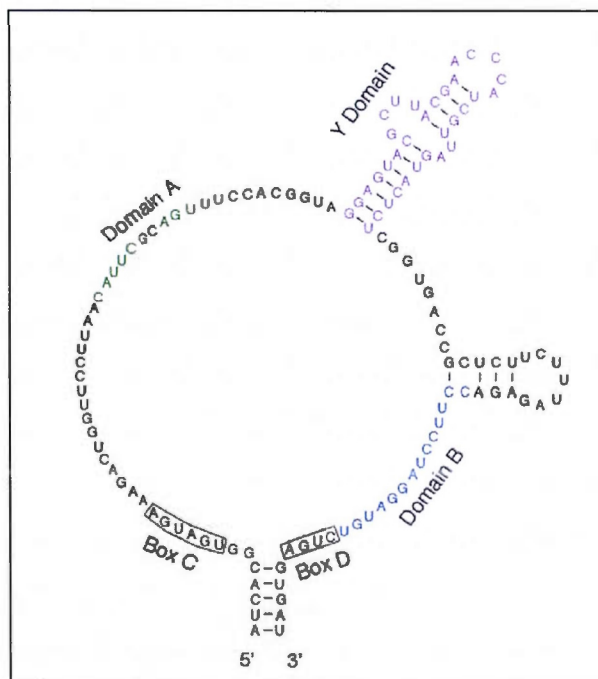


Figure 1.7 Structure secondaire d'U14 chez la levure *S. cerevisiae*

La molécule contient quatre éléments de séquences conservées. Les boîtes C et D sont nécessaires pour produire U14. Les domaines A, B et Y sont importants pour l'activité d'U14 puisqu'ils participent à la maturation des ARNr (Tirée de Liang et al., 1997)

1.4.2 SnoARN U3

Un autre snoARN très important est le snoARN U3 (Figure 1.8). Il est omniprésent chez les eucaryotes et il est nécessaire pour la maturation du pré-ARNr 18S (Dragon et al., 2002). En outre, U3 intervient de façon spécifique dans le clivage des ARNr durant la maturation des pré-ARNr, il est impliqué en particulier dans la maturation de l'ARNr 18S dans tous les organismes où il a été testé (Dragon et al., 2002). Chez *S. cerevisiae*, les snoRNP U3 ainsi que U14, SnR10 et SnR30 sont tous impliqués dans le clivage des pré-ARNr au niveau des sites A0, A1 et A2.

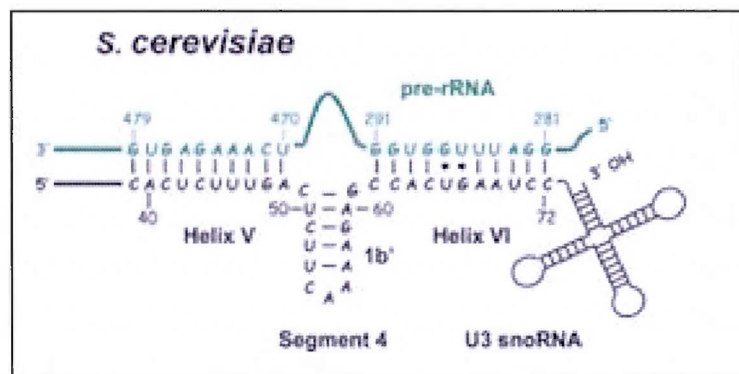


Figure 1.8 Représentation schématique de l'interaction entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 18S chez la levure *S. cerevisiae*

La figure montre une interaction entre le snoARN U3 et la région 5' ETS du pré-ARNr 18S chez la levure. Plus en détail, on observe une interaction (hélices V et IV) entre les boîtes A et A' chez le snoARN U3 et un segment du pré-ARNr 18S. La séquence du pré-ARNr est indiquée en vert. La séquence du snoARN est indiquée en noir. (Tirée de (Marmier-Gourrier et al., 2011)).

Il s'avère aussi que le complexe U3 est lié au 5'-ETS de l'ARNr. Ce complexe forme avec les pré-ARNr et d'autres facteurs additionnels la petite sous-unité connue sous le nom de SSU processome ou encore le pré-ribosome 90S (Dragon et al., 2002; Osheim et al., 2004).

1.5 Les hélicases

Les hélicases constituent une grande famille d'enzymes à activité ATPasique. Elles utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse d'un nucléotide 5'-triphosphate pour dissocier les liaisons hydrogène entre les deux brins d'ADN ou d'ARN, ce qui favorise le déroulement des duplex et la séparation des brins. Les hélicases sont également caractérisées par une activité translocase, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de décrocher des protéines fixées à l'ADN. Les hélicases peuvent être classées en six superfamilles (SF) sur la base d'acides aminés conservés dans leur séquence primaire. Elles se retrouvent dans tous les organismes, des bactéries à l'homme, et dans de nombreux virus (Linder et Fuller-Pace, 2013).

Les hélicases des SF1 et SF2 sont impliquées dans pratiquement tous les aspects du métabolisme de l'ADN et de l'ARN. Ces deux superfamilles d'hélicases ont un cœur catalytique hautement similaire. Ce cœur catalytique renferme 12 séquences caractéristiques qui forment la base de la subdivision initiale des hélicases. Les SF1 et SF2 sont constituées de familles caractérisées par des séquences très distinctes sur le plan structural. La famille Pif1-like (Fairman-Williams et al., 2010) et seulement quelques hélicases à ARN putatives telles que les hélicases Upf1-like font partie de la SF1. La plupart des hélicases à ARN appartiennent à la SF2, qui est probablement la classe la mieux caractérisée au niveau structural. Cette superfamille inclut les familles « DEAD-box », « DEAH-box », Swi/Snf et « Ski2-like ».

La SF3 comprend des hélicases putatives avec de petits domaines hélicasiques d'environ 100 acides aminés que l'on trouve dans des virus à ADN et ARN. Elles comportent également trois motifs conservés dont les deux motifs classiques de liaison à l'ATP. La SF4 se compose entre autres d'hélicases qui sont liées à des protéines constituées de cinq motifs qui forment généralement des structures

hexamériques (Caruthers et McKay, 2002). Les autres membres de la SF4, SF5 et SF6 sont des protéines qui s'assemblent aussi sous forme d'hexamères et qui sont constituées d'un module « RecA-like ». Ce dernier utilise l'énergie d'hydrolyse et de liaison des nucléotides pour accomplir sa fonction comme par exemple déplacer les acides nucléiques (Ye et al., 2004).

Les hélicases à ARN sont caractérisées par 9 motifs conservés. Le motif le mieux connu renferme la séquence peptidique D-E-A-D qui a permis de définir les protéines « DEAD-box », qui sont décrites dans la prochaine section. Ces hélicases à ARN de la famille à boîte « DEAD » sont impliquées dans tous les processus associés aux molécules d'ARN. Ceci inclut tous les procédés cellulaires tels que la maturation des ARN, la biogenèse des ribosomes, l'épissage de l'ARN, et la transcription et initiation de la traduction d'ARNm (Owttrim, 2006). À titre d'exemple le génome de la levure *S. cerevisiae* code pour 39 hélicases putatives impliquées dans le métabolisme de l'ARN.

Considérées comme des moteurs moléculaires capables de modifier la structure secondaire d'ARN, beaucoup de ces protéines possèdent une activité ATPase dépendante de l'ARN, qui est parfois stimulée par l'ARN spécifique des substrats. Si l'activité ATPasique leur est attribuée, il n'en est pas de même pour l'activité hélicasique puisque peu d'hélicases à ARN ont cette propriété. Il est possible que les hélicases à ARN impliquées dans la biogenèse des ribosomes ne soient pas nécessaires uniquement pour les dissociations des structures ARN-ARN mais qu'elles soient aussi impliquées dans les interactions protéine-protéine et la modulation de la spécificité ARN-protéine. Ces réarrangements structuraux assurent le bon déroulement de la synthèse des ribosomes (Daugeron et al., 2001). Des analyses biochimiques et génétiques ont montré qu'il existe au moins deux hélicases à ARN nécessaires pour l'initiation de la traduction chez la levure, notamment la protéine à

boîte DEAD eIF4 ("eukaryotic translation initiation factor 4") (Linder, 2003). L'interaction entre eIF4G et eIF3 assure le positionnement de la petite sous-unité 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. Une fois que la sous-unité 40S trouve l'extrémité 5' de l'ARNm, la numérisation de l'ARNm peut commencer pour la recherche d'un codon initiateur AUG afin de débiter la traduction. À ce premier codon, le GTP lié à eIF2 est hydrolysé et la grande sous-unité 60S du ribosome rejoint le complexe d'initiation (Kozak, 1989). Certaines protéines ont besoin d'interagir avec des cofacteurs pour accomplir leurs activités. Le facteur d'initiation 4A (eIF4A) en est un exemple. Ce dernier a une activité hélicasique faible qui est renforcée par eIF4B. La séquence primaire des hélicases à ARN contient un domaine hélicasique flanqué par des extensions N- et C-terminales. Ce corps hélicasique est composé de deux protéines recombinaise A (RecA). Bien que ces enzymes soient nécessaires pour le déroulement des structures secondaires des régions 5' non traduites des ARNm, leur rôle exact n'a pas été démontré de façon convaincante.

1.6 Les protéines « DEAD-box »

Les protéines « DEAD-box » ont d'abord été identifiées dans les années 80. Ce sont des ARN hélicases nécessaires dans les processus cellulaires impliquant des complexes de RNP (Johnson et McKay, 1999). Le nom de cette famille dérive de la séquence peptidique D-E-A-D (Asp, Glu, Ala, Asp) au niveau du motif II. Quoique certaines de ces enzymes aient été largement caractérisées *in vitro*, leurs propriétés *in vivo* sont encore peu décrites (Cordin et al., 2006). Elles possèdent une activité ATPase et hélicase, et peuvent interagir avec les ARNm. Dans la plupart des cas, l'hydrolyse de l'ATP est dépendante de l'ARN, ce qui met clairement la fonction biologique des protéines « DEAD-box » dans le contexte de l'ARN (Rocak et Linder, 2004). Conséquemment, il semble que l'inactivation de la plupart des protéines « DEAD-box » engendre une mauvaise synthèse protéique. On peut ainsi conclure

qu'elles sont susceptibles de jouer un rôle capital dans le processus de maturation des ARNr (Bradley et De La Cruz, 2012). De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de différentes protéines « DEAD-box » dans d'innombrables processus. La Figure 1.9 présente les processus cellulaires les plus éminents faisant intervenir quelques protéines « DEAD-box ». Parmi ces protéines, plusieurs sont impliquées dans la machinerie transcriptionnelle.

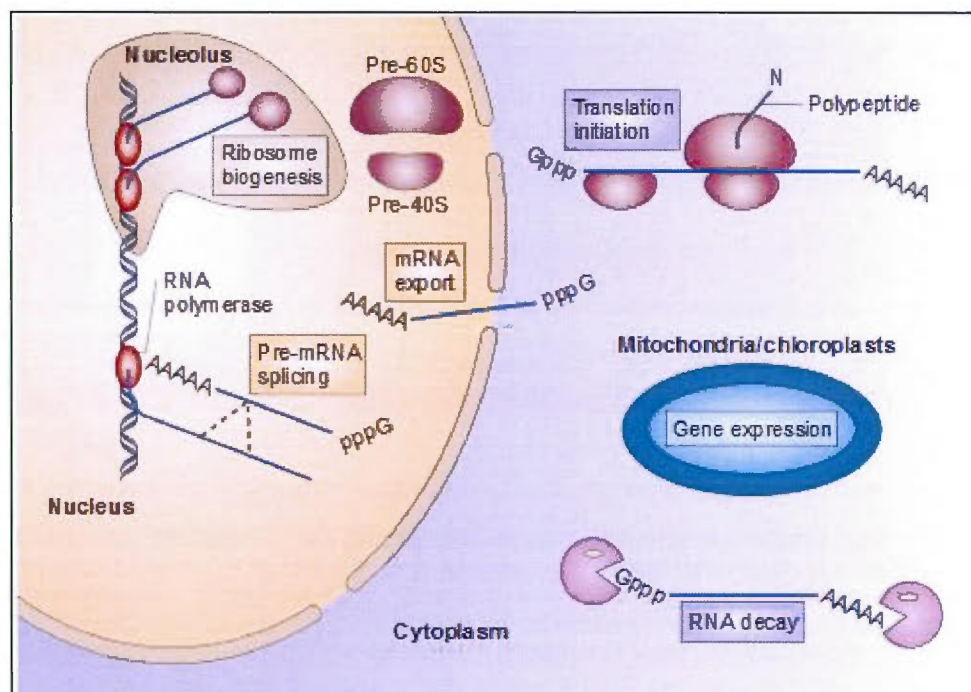


Figure 1.9 Les processus cellulaires impliquant les protéines « DEAD-box »

Chez la levure *S. cerevisiae* ainsi que dans d'autres organismes, les protéines « DEAD-box » assurent divers fonctions cellulaires. On parle notamment des hélicases putatives impliquées dans la **biogenèse des ribosomes**, tel que eIF4A (facteur d'initiation 4A chez les eucaryotes) ou encore Dbp10, une hélicase ATP-dépendante putative appartenant à la famille « DEAD-box » qui est essentielle à la biogenèse des ribosomes. **L'épissage des pré-ARNm** implique des ARN hélicases comme Prp5 qui stabilise l'association des introns de l'ARN avec les ribonucléoprotéines. **L'exportation d'ARNm** du noyau vers le cytoplasme nécessite la protéine « DEAD-box » Dbp5. **L'initiation de la traduction** implique le facteur d'initiation eIF4A qui permet principalement la réorganisation de la structure du duplex d'ARN. (Tirée de Rocak et Linder, 2004)

Chez la levure *S. cerevisiae*, on compte plus de 20 différentes protéines à boîte « DEAD », dont un grand nombre est essentiel pour la viabilité cellulaire (Shiratori et al., 1999). Les protéines « DEAD-box » sont caractérisées par l'utilisation d'ATP comme source d'énergie, ce qui les différencie des protéines « DEAH-box ». Ces dernières sont considérées comme des membres de la SF2 d'hélicase à ARN, une famille aussi impliquée dans le processus de biogenèse des ribosomes. Les protéines « DEAD-box » sont également impliquées dans les phénomènes d'initiation et traduction, et elles sont nécessaires pour la dégradation des molécules d'ARN. La plupart des protéines « DEAD-box » présente 9 motifs conservés (Figure 1.10). Par ailleurs, elles n'ont aucun domaine supplémentaire parfois présents dans d'autres protéines à boîte « DEAD » (Gargantini et al., 2012). Les différents motifs conservés des protéines « DEAD-box » sont décrits ci-dessous.

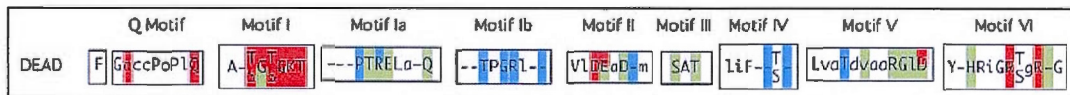


Figure 1.10 Présentation schématique des motifs conservés des protéines « DEAD-box »

Les résidus colorés sont ceux de la protéine Vasa (une « DEAD-box » de la drosophile) qui interagissent avec l'ATP (en rouge) ou l'ARN (en bleu), ou ceux qui sont impliqués dans des interactions intraprotéiques (en vert). (Tirée de (Linder, 2006))

Le motif Q : La séquence consensus de ce motif a été définie comme GaccPohQ (où a est un résidu aromatique qui semble-t-il serait unique chez les protéines « DEAD-box », c est un résidu chargé, o est un alcool, h est un résidu hydrophobe et l représente un résidu aliphatique). L'alignement de séquence a montré que ce motif renferme 9 acides aminés conservés dont une glutamine invariante, avec plus de 60% de conservation. Le résidu glutamine est présent dans la séquence de plus de 99% de ces motifs, et c'est la raison pour laquelle la séquence porte le nom de ce résidu. Le motif Q fait partie d'une structure sous forme de cap ("cap-like structure") (Cordin et al., 2006). Des études de mutagenèse *in vivo* chez la levure ont révélé que les 9

résidus conservés sont importants pour la viabilité cellulaire. D'autres analyses *in vitro* chez la levure ont montré que ces résidus sont nécessaires pour l'activité ATPasique. Ces résultats concordent avec des analyses réalisées sur les protéines « DEAD-box » (analyses de cristallisation par rayon X), qui ont révélé que le motif Q est impliqué dans la fixation de la base azotée des nucléotides. Il semble également que le motif Q soit impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP et dans la régulation de l'activité ATPasique *in vivo* (Tanner et al., 2003).

Le motif I : Connu aussi sous le nom de motif Walker A, il est commun à toutes les hélicases et également à de nombreuses NTPases. Ce motif (AxTGoGKT, où o est un alcool et x est un acide aminé non-chargé) est crucial pour les ATPases et les hélicases. En effet, une mutation touchant le premier résidu alanine, la lysine en position 7 ou encore le dernier résidu thréonine est capable de supprimer l'activité ATPasique en réduisant l'hydrolyse d'ATP. Il semble également être impliqué dans la liaison NTP en interagissant avec des ions magnésium (Cordin et al., 2006). Le motif I occupe sans doute une position centrale et cruciale puisqu'il interagit à la fois avec les motifs Q, I et II (Cordin et al., 2006).

Les motifs Ia et Ib : Ils ne semblent pas être impliqués directement dans la liaison à l'ATP ou dans l'hydrolyse, ce sont des motifs de fixation à l'ARN. Il paraît aussi que les motifs Ia et Ib du domaine I présentent une structure équivalente à celle des motifs V et IV respectivement. Une étude a montré qu'une substitution d'alanine au niveau du motif Ia chez les protéines « DEAD-box » altère leur activité hélicasique (Cordin et al., 2006).

Le motif II : Il est connu aussi sous le nom de motif Walker B (Walker et al., 1982). Tout comme le motif I, il utilise un atome de magnésium pour se complexer à l'ATP (Koonin et al., 1993). La principale caractéristique du motif II est sa contribution à

l'hydrolyse des NTP pour assurer l'activité de déroulement. Il est également hautement conservé dans sa séquence (Tanner, 2003).

Le motif III : Il est impliqué dans les activités hélicasiques et dans la liaison à l'ATP. Il s'avère que des mutations touchant le facteur d'initiation eIF4A ainsi que les protéines « DEAH-box » au niveau de ce motif entraînent une baisse de l'activité hélicasique. Il semble que le premier résidu du motif I soit à proximité du résidu sérine du motif III, et que ces derniers interagissent ensemble. Cette interaction ne semble pas être modifiée par la liaison d'un autre nucléotide. La substitution des résidus de ce motif réduit la vitesse d'hydrolyse de l'ATP ainsi que la liaison à l'ARN, ce qui a pour conséquence une réduction drastique de l'activité hélicasique.

Le motif IV : La séquence de ce motif reste encore mal élucidée. Tous les articles publiés sur les protéines « DEAD-box » présentent des séquences différentes de ce motif. Néanmoins, il se définit le plus souvent comme deux résidus aliphatiques (I, L, ou V) suivi par une phénylalanine. Le premier résidu du motif V est à proximité du résidu hydrophobe du motif IV, ce qui suggère une possibilité de connexion entre ces deux motifs. Toutefois cette observation doit être confirmée expérimentalement (Cordin et al., 2006).

Le motif V est proposé comme étant un motif de liaison à l'ARN en association avec les motifs Ia, Ib et IV. Un rôle lui est attribué dans l'activité ATPasique. Il semble que chez le facteur d'initiation eIF4A, le résidu arginine conservé du motif V interagit avec le motif II ou avec un oligonucléotide de liaison (Caruthers et al, 2000).

Le motif VI : Il semble important pour l'activité ATPasique et pour la liaison à l'ARN. Il a été proposé que le second résidu arginine de ce motif soit nécessaire pour les liaisons d'ATP et aussi pour l'hydrolyse. Il semble aussi que ce résidu fonctionne

comme « un doigt d'arginine » assurant la stabilité des ions Mg^{2+} au cours de l'hydrolyse d'ATP (Cordin et al., 2006).

En conclusion, les motifs I, II, Q et VI sont nécessaires pour la liaison d'ATP, tandis que les motifs Ia, Ib, III, IV, et V sont impliqués dans les réarrangements intramoléculaires et les interactions avec l'ARN (Tanner, 2003).

Comme évoqué précédemment, plusieurs mécanismes aussi complexes et dynamiques les uns que les autres font intervenir les protéines « DEAD-box ». Ces dernières sont nécessaires pour l'exportation des ARN et sont capables aussi de dissocier les facteurs nucléaires de l'ARNm ou encore de préparer l'ARNm pour le processus de traduction. On prend à titre d'exemple le facteur d'initiation eIF4A, sur la base d'une grande quantité de données expérimentales. Ce dernier réorganise la structure du duplex d'ARN à l'extrémité 5' de l'ARNm afin de le préparer à la formation de la petite sous-unité ribosomique. Dans le même enchaînement d'idées, il paraît que les protéines à boîte « DEAD » soient également impliquées dans l'expression des génomes mitochondriaux. En effet, il a été suggéré qu'une protéine « DEAD-box » chez la levure *S. cerevisiae* (Mss 116) soit impliquée dans l'épissage des introns mitochondriaux. Il s'agit d'un « chaperon d'ARN » dont la fonction principale est l'épissage des introns mitochondriaux des groupes I et II, et l'activation traductionnelle (Mohr et al., 2008). En outre, il a été proposé que les protéines « DEAD-box » soient nécessaires pour la dégradation des molécules d'ARN. En effet, il a été évoqué qu'une protéine « DEAD-box » hélicase ATP-dépendant (RhIB) soit capable de dégrader les structures d'ARN par l'action des PNPase ("polynucleotide phosphorylase", une protéine de dégradation d'ARN) (Rocak et Linder, 2004). La compréhension des mécanismes et fonctions liés aux protéines « DEAD-box » représente un enjeu important étant donné que ces hélicases à ARN sont impliquées dans divers processus essentiels à la vie de la cellule, tels que la

transcription, la réplication ou encore la biogenèse des ribosomes. Ce sont donc des cibles potentiellement intéressantes mais dont on ignore pour certaines d'entre elles les interactions moléculaires et cellulaires, comme c'est le cas pour la protéine Dbp4.

1.7 La protéine « DEAD-box » Dbp4

Certaines protéines nucléolaires présentent un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite. Ce dernier leur permet de pénétrer dans le noyau, puis elles s'accumulent dans le nucléole en vertu de liaison à d'autres composants nucléolaires (probablement ARNr) (Schmidt-Zachmann et Nigg, 1993). Dbp4 est une ARN hélicase nucléolaire qui ne présente pas de NLS, et qui nécessiterait donc une interaction avec d'autres protéines pour être importée dans le noyau. Cette protéine « DEAD-box » est impliquée dans la production de l'ARNr 18S qui entre dans l'assemblage de la sous-unité 40S. Cette hélicase putative de taille prédite de 87 kDa possède un homologue très conservé chez l'humain qui se nomme DDX10. Les deux séquences présentent une similitude de l'ordre de 40% sur toute leur longueur (Figure 1.11). Il semble que des mutations identifiées dans le gène de DDX10 soient associées au cancer du sein (Liang et al., 1997).

La protéine DBP4 ainsi que quatre autres ARN hélicases putatives ont jusqu'ici été liées à la maturation des ARNr. Il s'agit des protéines Rrp3, Drs1p, Spb4p et Dbp3p. La protéine Rrp3, comme DBP4, intervient dans la maturation de l'ARNr 18S. Les protéines Drs1p, Spb4p et Dbp3p sont impliquées dans la maturation de l'ARNr 25S et du pré-ARNr 27S. Cependant, les détails précis sur la façon dont ces protéines affectent la maturation des ARNr font encore défaut (Liang et al., 1997). Plusieurs études ont été menées pour expliquer les conséquences suite à un défaut de synthèse de la protéine Dbp4. En effet, l'inactivation de cette hélicase putative cause un déficit



Figure 1.11 Alignement de séquences des protéines « DEAD-BOX » DDX10 de l'humain et Dbp4 de la levure.

L'alignement des séquences a été obtenu par Clustal W. Les 9 motifs conservés des hélicases à ARN «DEAD-box» sont codés par couleur. Les deux séquences sont identiques à 40%. Les similitudes s'étendent au-delà du cœur catalytique, ce qui suggère une conservation fonctionnelle. (Tirée de Soltanieh, 2008)

en ARNr 18S mature et l'accumulation d'une forme aberrante d'ARNr 18S nommé pré-ARNr 23S. Il s'ensuit que la pré-particule 40S ne pourra pas accéder au cytoplasme et restera donc piégée au niveau du noyau, ce qui engendre naturellement

un déroulement anormal de la biogenèse des ribosomes et par conséquent un problème pour la synthèse protéique (Cretien et al., 2008). Certaines études ont montré que la surexpression de la protéine DBP4 pourrait rétablir la synthèse de l'ARNr 18S en facilitant sa liaison ou sa libération et aussi celle du snoARN U14 (Liang et al., 1997). D'autres études ont rapporté qu'un défaut de synthèse de Dbp4 inhibe le clivage du pré-ARNr au niveau du site A2, ce qui suggère que Dbp4 serait impliquée dans la synthèse de l'ARNr 18S. D'autre part, Dbp4 possède dans sa région C-terminale un motif d'interaction protéine-protéine de type « coiled-coil » (Figure 1.12) qui est conservé chez tous les orthologues de Dbp4.

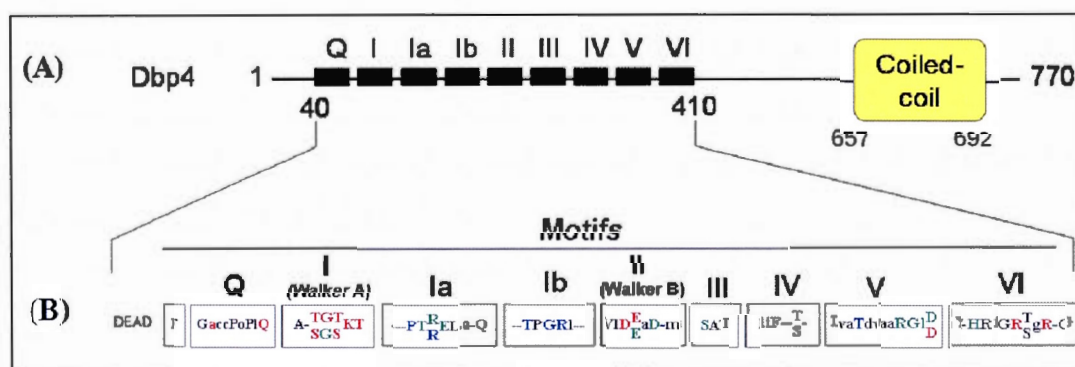


Figure 1.12 Représentation schématique de la structure primaire de la protéine Dbp4 de la levure

(A) Structure de Dbp4. Dbp4 est caractérisée par 9 motifs conservés qui forment le cœur catalytique de l'enzyme. Cette région est flanquée par deux extrémités N- et C-terminale. La partie C-terminale de Dbp4 renferme un motif d'interaction protéine-protéine « coiled-coil » qui renferme 35 acides aminés. (B) Motifs conservés chez les protéines « DEAD-box ». Les motifs Q, I et II sont impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP. Le motif III assure l'activité de déroulement. Le motif VI participe à la liaison de l'ATP. Les motifs Ia, Ib, IV et V sont impliqués dans la liaison de l'ARN. (Tirée de Lapensée, 2008)

La structure « coiled-coil » est composée de deux ou plusieurs hélices alpha retenues ensemble par l'intermédiaire d'enroulement de chaînes latérales. Les hélices, qui peuvent être disposées parallèlement ou antiparallèlement, tournent l'une autour de l'autre pour former des structures en forme de corde (Figure 1.13 a et b). L'enroulement de ces hélices est crucial pour assurer l'interface en continu des

bandes hydrophobes (Walshaw et Woolfson, 2001). Au niveau séquence, il existe un motif répétitif de sept résidus souvent désignés *abcdefg*. Les résidus hydrophobes sont en général en position a et d et forment une bande apolaire sur chaque hélice (Figure 1.13 c). Malgré cette apparence toute simple, les deux hélices enroulées présentent un degré considérable de diversité structurelle. La présence du motif « coiled-coil » suggère que Dbp4 pourrait nécessiter l'appui d'un cofacteur pour accomplir son activité hélicasique.

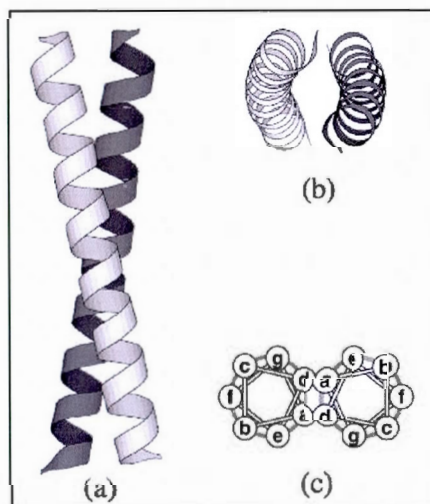


Figure 1.13 Représentation schématique de la structure « coiled-coil »

Enroulement de deux hélices (3.5 résidus par tour). (a) Un dimère parallèle « coiled-coil » typique. (b) Vue orthogonale de la structure de base. (c) Représentation de l'orientation et de l'interaction entre les deux hélices avec indication des positions heptades. (Tirée de Walshaw et Woolfson, 2001)

Des tests dans le système double-hybride chez la levure réalisés au sein de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence une forte interaction entre Dbp4 et une protéine nucléolaire du nom de Bfr2. Il s'agit d'un gène essentiel codant pour une protéine de 61,2 kDa (Chabane et Blangy, 2006). Tout comme Dbp4, cette protéine présente dans sa séquence un motif « coiled-coil » et elle est aussi impliquée dans la maturation de l'ARNr 18S. Bfr2 est également considérée comme un facteur de croissance nucléolaire, et elle est essentielle pour la croissance et la prolifération

cellulaire. Il est probable que Dbp4 ait besoin de former un complexe avec son partenaire nucléolaire Bfr2 pour assurer sa fonction ATPasique. Malgré tout ce qui est connu sur les propriétés de Dbp4, son rôle exact et sa fonction précise dans le processus de maturation des ARNr restent à élucider.

1.8 L'étude présente

Comparable à de la machinerie spécialisée, les ribosomes sont des organites cellulaires responsables de la production des protéines. La synthèse des ribosomes est une activité majeure de toute cellule vivante. Cette voie métabolique complexe permet la libération de deux sous-unités de tailles inégales et de formes différentes, à savoir la petite sous-unité 40S qui est constituée de l'ARN ribosomique (ARNr) mature 18S, et la grande sous-unité 60S formée des ARNr matures 5S, 5.8S et 25S. De nombreuses questions restent ouvertes concernant les mécanismes qui entrent en jeu dans la maturation des ARNr. La protéine Dbp4 est un bon candidat qui pourrait nous aider à affiner nos connaissances sur ce processus complexe. En effet, cette ARN hélicase est impliquée dans l'assemblage de la petite ribonucléoprotéine nucléolaire U14 et elle est également essentielle à la maturation de l'ARNr 18S chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Liang et al, 1997). L'étude de Dbp4 permettra donc d'éclaircir nos connaissances sur le processus de biogénèse des ribosomes. Cette protéine « DEAD-box » est caractérisée par neuf motifs conservés qui forment la région catalytique de l'enzyme. Elle porte aussi une région C-terminale dont la fonction est moins bien connue. Notre intérêt pour l'étude de la région C-terminale de Dbp4 découle de deux constatations :

- ❖ Dans un premier temps, des analyses non publiées de notre laboratoire ont démontré que la région C-terminale de Dbp4 est très importante pour sa fonction puisque sa délétion entraîne une létalité.

- ❖ La région C-terminale de Dbp4 présente un motif d'interaction protéine-protéine appelé « coiled-coil », qui est conservé chez tous les orthologues de Dbp4.

Nous souhaitons dans un premier temps identifier les acides aminés de la région C-terminale de Dbp4 qui sont importants pour la fonction de l'enzyme. Pour ce faire, nous avons généré des mutations aléatoires au niveau de la région C-terminale, et nous avons identifié et caractérisé des mutations létales. Il est probable que ces mutations affectent certaines propriétés de cette enzyme, entre autres la localisation nucléolaire, l'interaction avec ses partenaires protéiques, et sa fonction dans la maturation de l'ARNr 18S.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Création de la banque de mutants de Dbp4

Afin d'identifier les acides aminés importants pour la fonction de Dbp4, la technique de mutagenèse aléatoire par PCR (trousse GeneMorph, Stratagene) fut réalisée par des membres de notre laboratoire (principalement Sahar Soltani). Le but de cette PCR mutagénique était de créer des mutations aléatoires dans la région C-terminale du gène. Suite à la PCR, les fragments ont été substitués à la région C-terminale normale de Dbp4 dans le plasmide pDbp4::3HA (aussi généré dans notre laboratoire), où un épitope triple HA est présent en aval du gène Dbp4. Une banque de 60000 clones de levures (que je nommerai pDbp4mut::HA) a ainsi été générée et a été utilisée pour le criblage.

2.2 Souche de levure et milieux

La souche de levure promGAL1:Dbp4, générée dans notre laboratoire, a été utilisée pour le criblage. Dans cette souche, le promoteur du gène Dbp4 endogène a été remplacé par le promoteur de GAL1, ce qui rend l'expression de Dbp4 dépendante du galactose. Ce promoteur n'est pas actif en présence de dextrose. Les milieux de culture utilisés ont été préparés selon les protocoles standards (Ausubel et al., 1999). Il s'agit principalement de YP (1% yeast extract, 2% peptone) et de milieu minimal SC -Trp -Ura (6,7 g/L Yeast Nitrogen Base sans acides aminés, 0,72 g/L mélange d'acides aminés "drop out" sans tryptophane et sans uracile). La source de carbone a varié entre le dextrose et le galactose à une concentration finale de 2% pour générer

les milieux SD et SGal, respectivement. Les milieux solides ont été obtenus par l'ajout d'agar (20 g/L).

2.3 Déplétion des souches de levures de Dbp4

Les expériences de déplétion visaient à déterminer les conditions pour sevrer les cellules du galactose. Ceci était important pour les préparer au criblage sur milieu dextrose. Les cellules ont été cultivées et récoltées par centrifugation après passage dans le milieu YPD (pendant 16h): Elles ont été cultivées dans un milieu liquide contenant du galactose jusqu'à la phase exponentielle, puis récoltées et lavées avec de l'eau distillée. Elles ont ensuite été remises en suspension à une densité optique à 600 nm de 0,1 dans du milieu YPD préchauffé à 30°C. Au cours de la croissance, les cellules ont été maintenues en phase exponentielle ($A_{600} < 0,7$) par dilution avec du milieu YPD.

2.4 Criblage de la banque de clones Dbp4 mutés et identification des clones létaux

Un système génétique a été utilisé pour identifier les clones causant la létalité à partir de la banque de mutants. Dans ce système, la survie des levures de la souche *promGAL1 :Dbp4* sur milieu SD dépend d'une protéine Dbp4 fonctionnelle produite à partir des plasmides *pDbp4mut::HA* de la banque, suite à la transformation. L'expression de *Dbp4mut::HA* dans nos conditions est constitutive. Les plasmides de la banque portent à la fois le gène de sélection *URA3* qui donne aux levures la capacité de croître en absence d'uracile et aussi le gène de sélection *TRP1* qui permet aux levures de croître en absence de tryptophane (Figure 2.1).

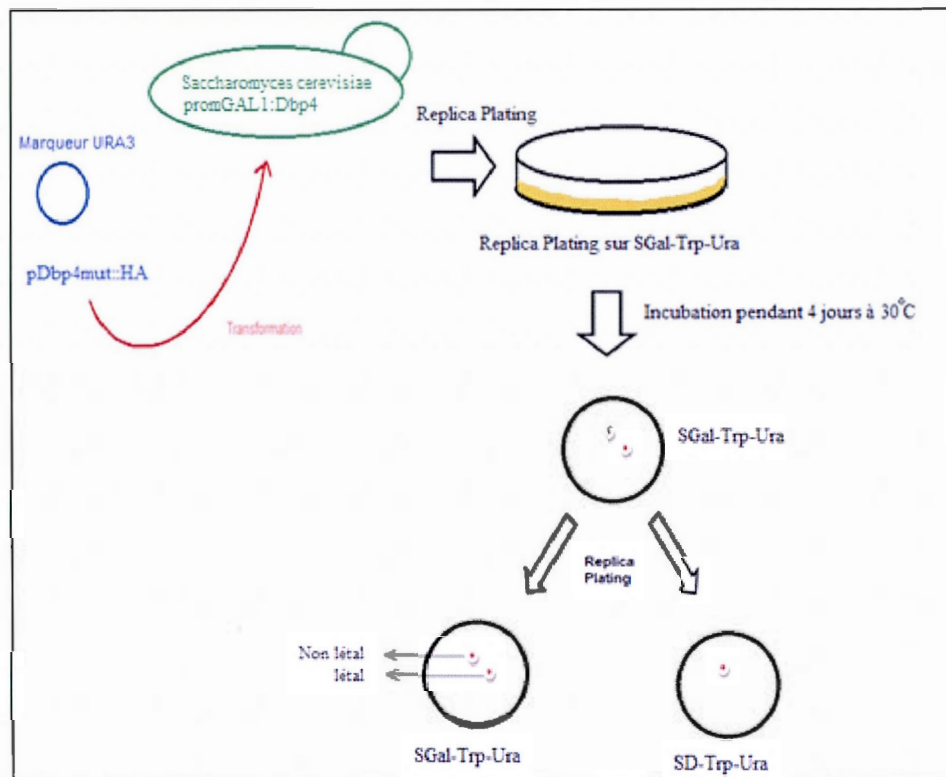


Figure 2.1 Criblage chez la levure *S. cerevisiae* par transformation d'une banque de mutants de Dbp4 et identification des mutants létaux.

La souche promGAL1:Dbp4 exprime la protéine Dbp4 sous le contrôle du promoteur GAL1 qui est actif en présence de galactose (SGal) mais inactif en présence de dextrose (SD). Après transformation, les cellules ont été étalées sur milieu sélectif SGal-Trp-Ura (les marqueurs *TRP1* et *URA3* sont contenus dans le plasmide pDbp4mut::HA). Les colonies sélectionnées sur milieu SGal-Trp-Ura ont été transférées sur milieu SGal-Trp-Ura (milieu contrôle) et sur milieu SD-Trp-Ura (test de survie). Les clones portant une mutation létale ne peuvent survivre sur milieu SD-Trp-Ura.

La méthode de transformation de levures par acétate de lithium consiste à fragiliser la membrane des levures pour favoriser l'introduction de l'ADN plasmidique dans les levures par choc thermique. La souche de *S. cerevisiae* promGAL1:Dbp4 a été inoculée dans 50 mL d'YPGal. Après incubation à 30°C sous agitation pendant toute la nuit, la solution a été centrifugée à 100g durant cinq minutes. Le culot obtenu a été resuspendu dans 50 ml d'eau stérile. Après une série de lavages, les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de TE/LiAc (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA et 100

mM acétate de lithium). À 100 μ L de cellules, on a ajouté 2 μ L d'ADN plasmidique (5 μ g/ μ L) (banque Dbp4mut::HA), 600 μ L de PEG/LiAc (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium et 50% polyéthylèneglycol) et 10 μ L d'ADN fragmenté ("sheared salmon sperm DNA", 50 μ g) préalablement soniqué et dénaturé pendant 3 minutes à 95°C. Le tout a été incubé 30 minutes à 30°C avec agitation (200 rpm) puis un choc thermique a été effectué. Les cellules ont été d'abord incubées à 42°C pendant 30 minutes et placées sur glace pendant 10 minutes. Afin de sédimenter les cellules, elles ont été centrifugées cinq secondes à 10 000g. Les cellules ont été resuspendues dans 500 μ L de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) et 70 μ L ont été étalés en parallèle sur milieu SGal -Trp -Ura. Les cultures ont été incubées pendant trois jours à 30°C. Afin de mettre en évidence les clones létaux de Dbp4, les colonies sélectionnées sur milieu SGal -Trp -Ura ont été étalées sur milieu SGal -Trp -Ura et sur milieu SD -Trp -Ura. Les colonies qui n'ont pas pu croître sur milieu SD -Trp -Ura ont permis d'identifier les clones plasmidiques portant une mutation létale de Dbp4.

2.5 Analyse des protéines par SDS-PAGE et immunobuvardage de type western

Une fois que les mutants létaux ont été mis en évidence par absence de colonies sur milieu SD, il a été possible d'identifier les clones létaux de pleine longueur. Nous avons utilisé la méthode d'immunobuvardage pour analyser les protéines exprimées par les clones létaux. Des anticorps anti-HA ont été utilisés. Comme l'épitope HA se trouve à l'extrémité C-terminale des protéines Dbp4, seules les protéines de pleine longueur peuvent être détectées. Une deuxième analyse faite avec des anticorps anti-Dbp4 a permis de révéler la protéine endogène (de pleine longueur) et les protéines Dbp4mut plus courtes qui n'ont pas été détectées avec les anti-HA.

Pour l'extraction des protéines cellulaires, nous nous sommes basés sur la technique de Kushnirov (Kushnirov, 2000). Une quantité de cellules a été resuspendue dans 200 μ L d'eau distillée. Une solution de NaOH 0,2 N a été utilisée pour lyser les cellules durant une incubation de 5 minutes à température pièce. Les débris ont été sédimentés par centrifugation pendant 1 minute à vitesse maximale, puis les surnageants ont été mélangés à volume égal avec du tampon d'échantillon SDS-PAGE 2X. La solution a été placée à 95-100°C pendant 5 minutes. Après centrifugation, les protéines contenues dans les surnageants ont été séparées par électrophorèse dans un gel SDS-PAGE de 8% à un voltage constant de 100 V jusqu'à la sortie du front de migration. Les protéines ont été transférées par électrotransfert, à voltage constant de 100 V durant 30 minutes dans du tampon Towbin (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol), sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) préalablement traitée 30 secondes au méthanol. La membrane a été bloquée pendant une heure avec une solution de TBS-Tween (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 136,8 mM NaCl, 0,2% Tween-20) contenant 5% de lait écrémé en poudre. Une première incubation a été effectuée avec un anticorps monoclonal de souris anti-HA pendant 1 heure. Après une série de lavages avec du TBS-Tween, la membrane a été incubée dans du TBS-Tween contenant un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à une peroxydase. La même membrane a été incubée une deuxième fois avec un anticorps monoclonal de lapin anti-Dbp4 pendant une heure. Après une série de lavages avec la solution TBS-Tween, la membrane a été incubée une dernière fois avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin en présence de la solution TBS-Tween. Les protéines-cibles ont été révélées avec ECL PlusTM (GE Healthcare) et par exposition de la membrane à un film autoradiographique.

2.6 Bactéries et milieux

Les bactéries compétentes *E. coli* DH10 α ont été préparées comme suit. Une pré-culture bactérienne de 5 mL a été utilisée pour inoculer 500 mL de LB et le milieu a été incubé à 37°C avec agitation. À une DO_{600nm} égale à 0,6, la culture a été transférée dans des bouteilles à centrifugation puis maintenue à 0°C pendant 10 minutes. Après une centrifugation à 2°C pendant 20 minutes à 5000g, le culot a été suspendu dans 40 mL de glycérol 10% stérile. Afin de bien laver le culot, l'étape précédente a été répétée trois fois de suite. Le culot obtenu a été suspendu dans environ 2 mL de glycérol 10%, selon la taille du culot. Des aliquots de 100 μ L ont été congelés dans un bain de glace sèche éthanol puis conservés à -80°C.

Une fois les clones létaux de pleine longueur mis en évidence par immunobuvardage, on a procédé à l'étape d'isolement des plasmides mutants à partir des levures sélectionnées. Les colonies ont été piquées et cultivées dans du milieu YPGal pour la nuit. Après sédimentation par centrifugation, la paroi des levures a été détruite par broyage avec des billes de verre puis les plasmides ont été isolés avec la trousse "Plasmid DNA Extraction Miniprep Kit" (Feldan). Ces plasmides ont été ensuite électrotransformés dans les bactéries compétentes DH10 α , et les transformants ont été sélectionnés sur milieu solide LB (1% bacto-tryptone, 0,5% yeast extract et 0,5% NaCl) contenant de l'ampicilline (100 μ g/mL). Des cultures liquides ont été utilisées pour amplifier les plasmides.

Pour s'assurer que les plasmides isolés portent bien des mutations létales de Dbp4, ces derniers ont été retransformés dans la souche promGAL1:Dbp4. L'étalement sur milieux SGal et SD a permis de confirmer la létalité des mutants de Dbp4 puisque les clones létaux ont pu croître sur milieu SGal mais pas sur milieu SD. Les clones létaux

ont été séquencés au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, et un alignement des séquences a été réalisé avec ClustalW2 (EMBL-EBI).

2.7 Extraction de l'ADN génomique de levure

La procédure d'extraction de l'ADN génomique a été réalisée selon un protocole standard (Ausubel et al., 1999). Une colonie de la souche de levure (YPH499) a été inoculée dans 50 mL de milieux YPD. La solution a été incubée à 30°C durant toute la nuit. Un volume correspondant à 10 mL de cette solution a été centrifugé pendant 5 minutes à 2000g. Le culot a été resuspendu dans 500 µL d'eau distillée puis centrifugé pendant 5 secondes. Le culot récupéré a été resuspendu dans 200 µL de tampon de lyse (Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% p/v, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM). Un volume de 200 µL de billes de verre (0,3g) de 450-625 µm de diamètre (Sigma) et 200 µL de solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) ont été ajoutés. L'ensemble de la solution a été mélangé au vortex pendant 3 minutes à puissance maximale puis centrifugé pendant 5 minutes à 12000g. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau microtube, 1 mL d'éthanol a été ajouté puis la solution a été mélangée par inversion avant d'être centrifugée pendant 3 minutes à 12000g. Le culot récupéré a été resuspendu dans 400 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) et 30 µg de RNase A. L'ensemble a été mélangé et incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'ADN a été précipité en ajoutant 10 µL d'acétate d'ammonium (4 M) et 1 mL d'éthanol et l'ensemble du mélange a été brassé par inversion puis centrifugé pendant 3 minutes à 12000g. Le culot obtenu a été séché à température ambiante avant d'être resuspendu dans 100 µL de tampon TE.

2.8 Tests de co-immunoprécipitation

Étant donné que les ARN hélicases jouent des rôles importants dans des processus nécessitant de gros complexes ARN-protéines, il est probable que Dbp4 agisse en association avec d'autres protéines pour accomplir sa fonction. La technique de double hybride chez la levure peut être utilisée pour identifier des protéines qui se lient à une protéine d'intérêt, ou pour délimiter des domaines ou des résidus critiques pour l'interaction (Fields et Sternglanz, 1994). Cette méthode a été réalisée par des membres de notre laboratoire afin d'identifier les partenaires potentiels de Dbp4. Parmi ces partenaires, la protéine nucléolaire Bfr2 présente une forte affinité pour Dbp4. Il était donc intéressant de vérifier si les interactions ont lieu entre les mutants sélectionnés et Bfr2. Dans notre cas, la co-immunoprécipitation fut adoptée puisque c'est la méthode principale utilisée pour étudier les interactions protéiques. Elle est basée sur l'utilisation de fusions des deux protéines avec des « étiquettes » différentes, qui sont des protéines ou peptides pour lesquelles des anticorps sont disponibles.

Extraction des protéines: L'extraction des protéines a été réalisée par lyse cellulaire à l'aide de billes de verre ("acid washed beads", Sigma) dans le tampon de lavage des levures. Les échantillons ont été mélangés au vortex pendant 45 secondes puis placés dans la glace pendant la même durée. Ces deux étapes ont été répétées 7 fois de suite avant de sédimenter les débris par centrifugation à 13000g durant 10 minutes à une température de 4°C.

Couplage anticorps-billes : Les billes de protéine-A agarose (Roche) préalablement incubées avec l'anticorps monoclonal anti-HA de souris ont été lavées 5 fois avec le tampon TMN100. Pour chaque échantillon, 40 µL de billes couplées à l'anticorps HA ont été incubés avec l'extrait de protéines pendant 2 heures pour lier Dbp4. Le mélange a été centrifugé pendant 45 secondes à 13000g, le surnageant a été récupéré

et le culot de billes résultant a été lavé 5 fois avec le tampon TMN100. Le culot de billes a été resuspendu dans du tampon d'échantillon de Laemmli 2X, tandis que 25 μ L de surnageant ont été mélangés avec du tampon 6X. Les différents échantillons ont été chauffés puis centrifugés pendant 5 secondes à 13000g de façon à sédimenter les billes et les débris. Enfin, 25 μ L de chaque échantillon ont été séparés sur un gel SDS-PAGE de 8%, et les protéines ont été analysées par immunobuvardage tel que décrit précédemment. Nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris anti-GFP afin de détecter la protéine Bfr2 puisque celle-ci est sous forme Bfr2::GFP dans la souche utilisée.

2.9 Microscopie par immunofluorescence

La technique de microscopie par immunofluorescence a été réalisée selon le protocole décrit par Gerus (Gerus et al., 2010). Pour ce faire, les cellules de levures en phase exponentielle de croissance ont été traitées au formaldéhyde 10%. Après deux heures d'incubation à 30°C, les cellules ont été resuspendues avec un tampon obtenu par mélange de 10 μ l de vanadium ribonucleoside 200 μ M, 2 μ l de phenylmethylsulfonyl fluoride 0,1 M, 2 μ l de β -mercaptoethanol 14,3 M et 30 μ l d'enzyme zymolase 10 mg/ml pendant une heure à température ambiante. En parallèle, des lamelles ont été traitées pendant une heure avec de la poly-L-lysine (Sigma). On a procédé par la suite au lavage des lamelles (pour enlever l'excédent de la poly-L-lysine) avec du PBS contenant 0,1% BSA et 0,1% NP-40. Les levures ont été ensuite fixées sur ces lamelles.

Une première incubation a été réalisée pendant 2 heures à température pièce dans une solution de PBS et 0,1% BSA contenant un anticorps polyclonal de lapin anti-CBF5 ("Centromere-Binding Factor 5"; une ribonucléoprotéine nucléolaire) dilué 1:400 et un anticorps monoclonal de souris anti-HA dilué 1:200. L'anticorps anti-CBF5 a été

produit par des membres de notre laboratoire (principalement Vincent Lemay). Le peptide synthétique KEYVPLDNAEQSTSC fut utilisé pour la production de l'anticorps et une analyse par immunobuvardage a révélé que l'anticorps dirigé contre CBF5 reconnaît une protéine de 55 kDa.

Ensuite, deux étapes de lavage ont été réalisées : un premier avec du PBS contenant 0,1% BSA et un second avec du PBS contenant 0,1% BSA et 0,1% NP-40. Une seconde incubation a été réalisée pendant 30 minutes dans une solution de PBS en présence d'anticorps anti-IgG de souris conjugués à l'Alexa Fluor 555 (Invitrogen; pour détecter l'épitope HA, donc la protéine Dbp4) dilué 1:1000, d'anticorps anti-IgG de lapin conjugués à l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen; pour détecter la protéine CBF5), et de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) à 0,1 µg/ml. L'Alexa fluor 555 émet une fluorescence rouge tandis que l'Alexa Fluor 488 émet une fluorescence verte. Le DAPI se fixe sur l'ADN nucléaire et émet une fluorescence bleue. Les lames ont subi une dernière étape de rinçage avec PBS contenant 0,1% BSA et 0,1% NP-40, puis ont été observées avec un microscope inversé Ti Eclipse (Nikon) équipé d'un objectif apochromatique. Les images ont été capturées avec une caméra CCD monochrome (CFW1312 de Scion Corporation) en utilisant les combinaisons de filtres appropriées pour la détection de chacun des trois fluorophores.

2.10 Technique de buvardage de type northern

Pour vérifier si les protéines Dbp4 mutantes non-fonctionnelles affectent l'activité de Dbp4 au niveau du clivage de l'ARNr 18S, la technique de buvardage de type northern fut adoptée. Elle nous permet de détecter la présence d'ARN spécifiques, à l'aide d'oligonucléotides radiomarqués.

Récolte des cellules et extraction d'ARN. Les cellules de levures recueillies à une DO_{600nm} de 10 unités ont été lavées avec de l'eau distillée puis centrifugées pendant 5 minutes à 4°C avant d'être congelées à -80°C pendant toute la nuit. Les levures ont été resuspendues dans 400 µL de TES (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS), ensuite 400 µL de phénol acide (Sigma P-4682) ont été ajoutés à la solution. Après centrifugation de 5 minutes à 4°C, la phase aqueuse a été placée dans un nouveau tube auquel on a ajouté 400 µL de phénol acide. Une fois la solution centrifugée, 400 µL de chloroforme ont été ajoutés à la phase aqueuse, le mélange a subi une dernière centrifugation. Les ARN ont été précipités avec 40 µL d'acétate de sodium 3 M pH 5,3, 2 µL de glycogène (20 µg/µL) et 400 µL d'éthanol froid. La solution d'ARN ainsi obtenue a été placée à -80°C pendant toute la nuit. Le mélange a été centrifugé pendant 5 minutes à 4°C, le culot a été resuspendu dans du TE, puis la quantité d'ARN a été mesurée par DO à 260 nm.

Transfert sur gel. Une fraction de 10 µg d'ARN a été séparée dans un gel dénaturant agarose-formaldéhyde (1,5% d'agarose, 36 mL de formaldéhyde 37%, 20 mL de MOPS 10X (Sigma M-5755), 2 µL de GelRed dilué au 1/1000). Le gel migré a été placé dans une solution de MOPS 1X à 59 volts pendant 3 heures. Il a ensuite été retiré et placé dans un volume de 500 mL d'une solution de NaOH (0,05 N) pendant 20 minutes. Après trois lavages à l'eau distillée, le gel a été placé dans 500 mL d'une solution de SSC 20X pendant 45 minutes. Pour l'étape de transfert par capillarité, le gel a été déposé sur une éponge immergée dans une solution de SSC 20X. Une membrane de nitrate de cellulose a été placée sur le gel puis recouverte de papiers essuie-tout et d'un poids.

Transfert et hybridation. Après plusieurs heures de transfert, les ARN ont été fixés à la membrane par irradiation aux UV. La membrane a été par la suite incubée avec une sonde étiquetée de façon radioactive. Les oligonucléotides spécifiques aux ARN à

détecter ont été phosphorylés avec de l'adénosine-tri-phosphate radioactif ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP) avec la T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) selon les spécifications du manufacturier. Les nucléotides libres après le marquage des oligonucleotides ont été retirés grâce au «Nucleotide Removal Kit» de QIAGEN. Une quantité de 20 millions de CPM de sonde pour 20 mL de solution de pré-hybridation (Solution Denhardt's 50X, SSPE 20X et SDS 20%) a été incubée avec la membrane à 37°C pour la nuit dans un four à hybridation. La membrane a été ensuite lavée trois fois dans le four à 37°C. Les deux premiers lavages ont été effectués avec du SSPE 5X (3,6 M NaCl, 200 mM sodium phosphate à pH 6,8 et 20 mM EDTA) avec 0,1% SDS et le troisième avec du SSPE 0,5X avec 0,1% SDS. La membrane a été exposée avec un écran au phosphore ou un film à autoradiographie et les signaux ont été révélés avec le Molecular Imager F/X (Bio-Rad) ou par traitement du film dans un développeur automatique.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

L'élaboration de techniques qui permettent de visualiser les séquences d'acide nucléique et les relations des gènes les uns avec les autres représentent un grand pas en avant pour la compréhension du fonctionnement d'une cellule. Un gène est un morceau d'ADN qui définit la synthèse d'un acide ribonucléique, ou ARN. Certains ARN, les ARNm, peuvent être lus, transcrits et traduits en protéines. Entre l'ADN (le gène) et la protéine il existe d'autres types d'ARN qui jouent le rôle de médiateurs au cours de la traduction. Ces mécanismes constituent un point de régulation important pour l'expression des gènes. La compréhension des mécanismes liés à l'ARN représente un enjeu dans la lutte contre certaines pathologies. Les hélicases à ARN sont impliquées dans de nombreux processus essentiels à la vie d'une cellule tels que la transcription ou encore la biogenèse des ribosomes. Ce projet de recherche vise à élucider la fonction d'une ARN hélicase du nom de Dbp4 (« DEAD-box protein 4 ») chez la levure *S. cerevisiae*. Celle-ci est une protéine nucléolaire essentielle impliquée dans la biogenèse de la sous-unité ribosomique 40S.

3.1 Identification des mutants létaux de Dbp4

La souche de levure utilisée pour réaliser la plupart des expériences est la souche promGAL1:Dbp4 où le promoteur du gène Dbp4 a été remplacé par le promoteur de GAL1, ce qui rend l'expression de Dbp4 dépendante du galactose. Le système génétique élaboré dans notre laboratoire a permis de générer une banque de 60000 clones qui se caractérisent principalement par la présence de simple mutation ou de plusieurs mutations au niveau de la partie C-terminale de Dbp4. Les clones portant une mutation létale ont été sélectionnés par absence de colonies sur milieu SD-Trp-

Ura (puisque le promoteur GAL1 est actif en présence de galactose SGal mais inactif en présence dextrose SD). L'identification des clones de Dbp4 létaux de pleine longueur a été réalisée par immunobuvardage de type western, sur des cellules poussées en milieu SGal. Cette méthode d'analyse fut réalisée dans le but d'analyser les protéines exprimées par les clones létaux. Des anticorps anti-HA ont été utilisés. Comme l'épitope HA se trouve à l'extrémité C-terminale des protéines Dbp4, seules les protéines de pleine longueur peuvent être détectées. Une deuxième analyse faite avec des anticorps anti-Dbp4 (capables de détecter Dbp4, à 100 kDa) a permis de révéler les protéines de pleine longueur (endogènes ou mutantes) et les protéines Dbp4mut plus courtes qui n'ont pas été détectées avec les anti-HA (Figure 3.1).

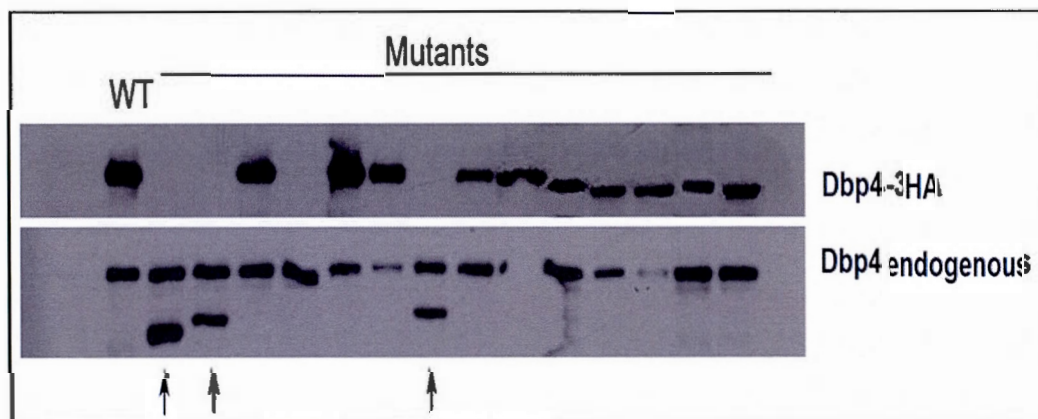


Figure 3.1 Identification des clones létaux de pleine longueur de Dbp4 de la levure

Les 14 clones létaux ont été sélectionnés au hasard et analysés par immunobuvardage avec des anticorps anti-HA, qui permettent de détecter uniquement les protéines de fusion de pleine longueur (panneau du haut). Une deuxième analyse a été faite avec des anticorps anti-Dbp4 (panneau du bas) pour détecter la protéine endogène et les protéines de fusion tronquées qui n'ont pas été détectées avec les anticorps anti-HA (pistes indiquées par une flèche).

À ce jour, nous avons analysé près de 10000 clones. Nos résultats indiquent que 2% des clones contiennent des mutations létales. De ce nombre, 94 produisent une Dbp4 mutante de pleine longueur. Quelques clones létaux de pleine longueur ont été séquencés et sélectionnés au hasard pour le reste des expériences.

Pour les expériences de déplétion, deux mutants de Dbp4 issus du criblage ont été sélectionnés au hasard. Les souches de levures ont été cultivées d'abord sur SGal puis transférées 16 heures à 30°C sur milieu YPD (Figure 3.2). Le taux de croissance de la souche promGAL1:Dbp4 est demeuré semblable à celui de la souche parentale ainsi que les deux mutants sélectionnés de Dbp4 pendant environ les huit premières heures. Le taux de croissance des deux mutants ainsi que la souche promGAL1:Dbp4 sur milieu YPD a progressivement diminué à partir de dix heures comparé à la souche parentale YPH499.

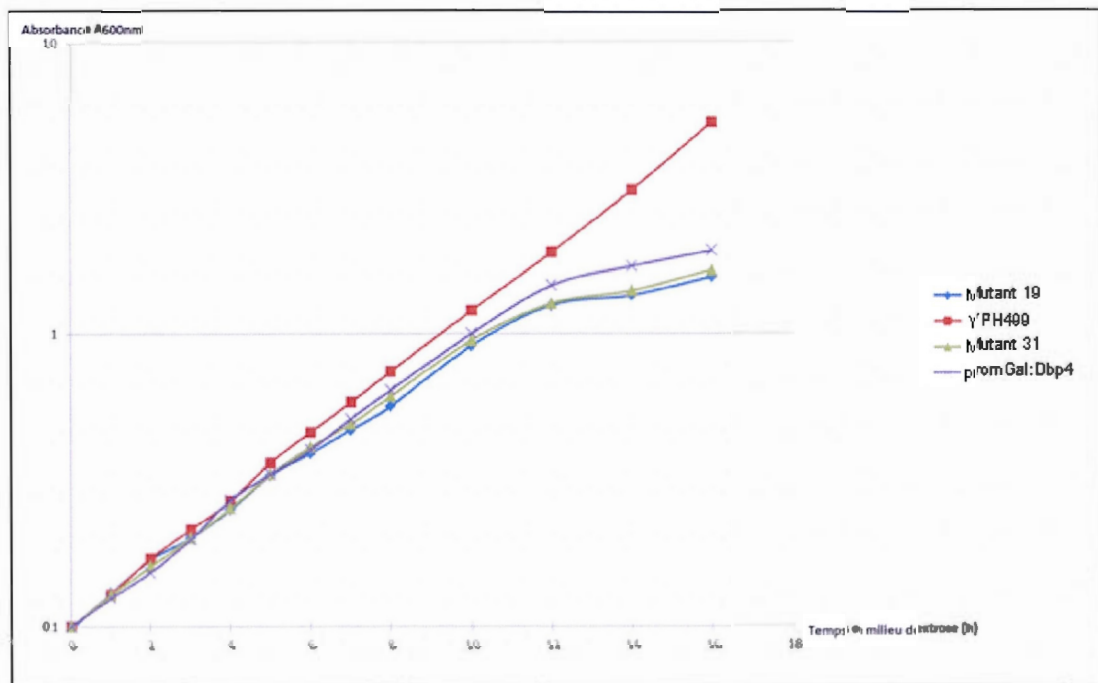


Figure 3.2 Courbes de croissance de levures en milieu liquide contenant du dextrose

Après croissance dans du milieu SGal, les cellules ont été transférées dans du milieu YPD et la densité a été mesurée sur une période de 16 heures. La souche parentale de levure *S. cerevisiae* YPH499 produit une Dbp4 endogène et sert de contrôle positif (en rouge). La souche promGal:Dbp4 n'est pas censée pousser sur milieu YPD, qui contient du dextrose (en mauve). Deux mutants létaux de Dbp4 ont été sélectionnés: Mutant 19 (en bleu) et Mutant 31 (en vert). On observe une croissance lente des deux mutants de Dbp4 comparée à la souche promGal:Dbp4.

3.2 Position des mutations létales de Dbp4

Afin d'élucider le rôle et la fonction de la partie C-terminale de Dbp4, nous nous sommes intéressés à l'étude de mutations létales dans cette région de cette hélicase putative. Pour ce faire, une technique de mutagenèse aléatoire ciblant la partie C-terminale de Dbp4 a permis de créer des mutations dans cette région et ainsi d'identifier les résidus qui sont essentiels à la fonction de l'enzyme. Dbp4 possède une longue extension C-terminale peu conservée qui est importante pour sa fonction et qui pourrait être spécifique à un substrat. Des membres de notre laboratoire ont pu démontrer que la délétion de la partie C-terminale de Dbp4 entraîne une létalité, ce qui suggère que cette extension C-terminale est importante pour l'activité de Dbp4. De plus, des études complémentaires ont révélé que lorsque la partie C-terminale est éliminée, il en résulte une diminution de l'activité ATPasique, ce qui insinue l'implication du domaine C-terminale dans l'activité ATPasique de Dbp4. Le séquençage de quelques mutants de pleine longueur a permis de déterminer la position des mutations létales de Dbp4. Cette approche a dévoilé que les mutations létales sont réparties principalement tout au long de la partie C-terminale. Certains clones présentent des mutations uniques (Figure 3.3). Il semble aussi que certains clones portent plusieurs mutations (Figure 3.4), six d'entre elles se situent dans le motif « coiled-coil ».

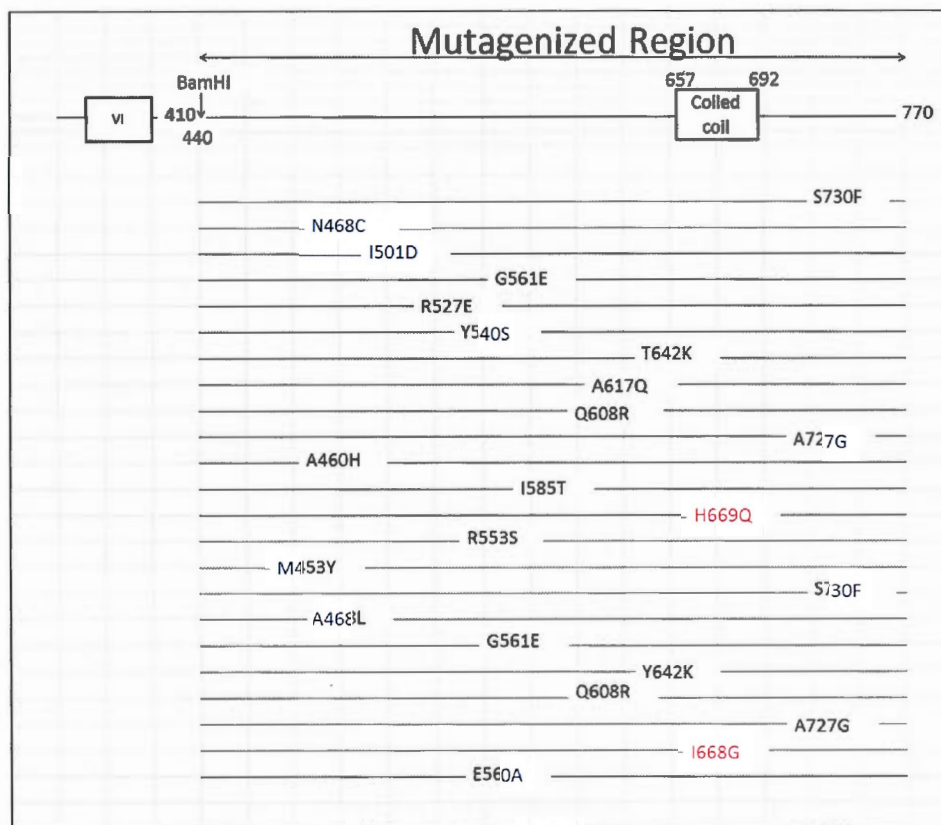


Figure 3.3 Position des mutations létales chez les clones de Dbp4 à simple mutation, chez la levure

Le séquençage des mutants de pleine longueur a révélé que 23 clones portent des mutations uniques. La position de chaque mutation est indiquée ainsi que les substitutions d'acides aminés correspondantes. Deux clones présentant une mutation au niveau du « coiled-coil » sont indiqués en rouge.

Tel qu'illustré sur la Figure 3.4, les mutations multiples sont regroupées principalement au début de l'extrémité C-terminale et plus précisément en aval du motif VI. Il semble également que plusieurs clones présentent des mutations répétitives, principalement les mutations aux positions 455 et 456 où une valine est substituée par une arginine et une arginine est remplacée par une isoleucine respectivement.

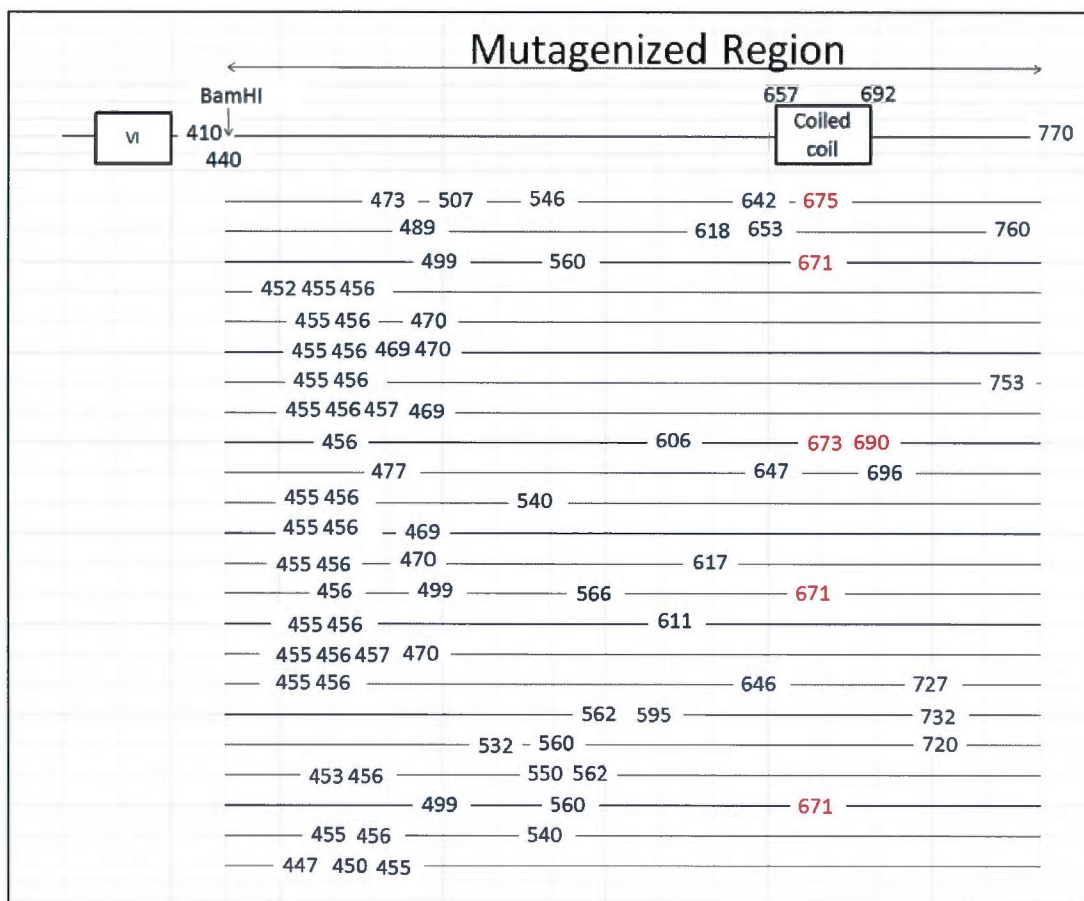


Figure 3.4 Position des mutations létales chez les clones de Dbp4 à multiples mutations, chez la levure

Le système génétique utilisé a permis d'obtenir des clones de pleine longueur. Le séquençage de certains de ces clones a indiqué plusieurs clones à mutations multiples. Quelques clones présentent des mutations situées au niveau du motif « coiled-coil » (indiqués en rouge).

Dans ce travail, j'ai étudié seulement certains clones à mutation unique. Le choix d'analyser ces clones repose principalement sur le fait qu'un seul acide aminé soit substitué à la fois. L'interprétation des résultats est donc simplifiée.

3.3 Analyse de l'interaction entre Dbp4 et Bfr2 par co-immunoprécipitation

Nous avons vérifié si une des mutations non fonctionnelles de Dbp4 empêche l'interaction avec son partenaire nucléolaire Bfr2. Pour ce faire, la technique de co-immunoprécipitation fut adoptée puisque c'est la méthode principale d'étude des interactions protéiques. Nous avons utilisé une construction Bfr2::GFP (une protéine Bfr2 endogène marquée avec une étiquette GFP) qui est disponible dans notre laboratoire. Cette construction a été transformée dans les souches de levure mutantes Dbp4mut::HA. Les cellules ont été par la suite étalées sur milieu SGal -His et incubées pendant trois jours à 30°C. Les colonies qui ont poussé ont été utilisées pour inoculer des milieux sélectifs liquides. Les protéines Dbp4mut::HA ont été immunoprécipitées et les partenaires d'interactions ont été ensuite détectés par immunobuvardage spécifique de la protéine cible (ici, Bfr2::GFP). Lorsque la membrane a été révélée avec un anticorps anti-GFP, une bande de 75 kDa a été détectée dans les IP (dernier puit) (Figure 3.5) réalisée avec un mutant Dbp4, suggérant que ce dernier est capable d'interagir avec Bfr2 même en présence d'une mutation létale. Cette observation indique que cette mutation non fonctionnelle n'empêche pas l'interaction entre le mutant Dbp4 et Bfr2. Aucun signal n'a été détecté dans l'immunoprécipitation réalisée avec le contrôle négatif (la souche parentale YPH499). Faute de temps, les autres mutants n'ont pas été analysés.

3.4 Localisation par immunofluorescence

A travers ce volet, on voulait vérifier si une mutation non fonctionnelle de Dbp4 va affecter sa localisation nucléolaire. Pour ce faire, la technique de microscopie par immunofluorescence fut adoptée. Le principe est de réussir à marquer la protéine que l'on veut localiser dans la cellule avec une molécule fluorescente. Selon les fluorophores que nous avons utilisés, le rouge (anti-HA) permet de détecter les

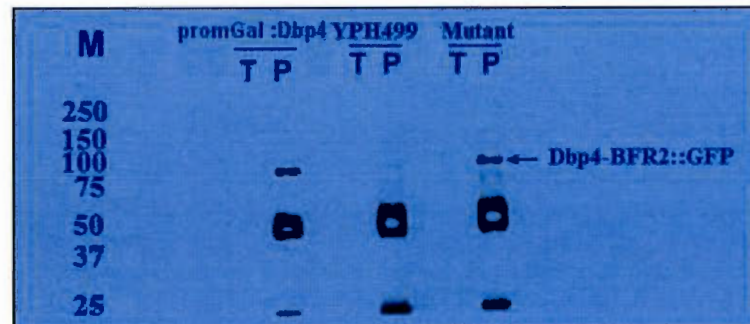


Figure 3.5 Analyse de l'interaction entre Dbp4 et Bfr2 dans la levure par co-immunoprécipitation

L'immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA a permis de précipiter Dbp4::HA. T : lysat total, P : précipité. La membrane a été révélée par immunobuvardage avec un anticorps anti-GFP qui a permis de détecter Bfr2::GFP. Une bande de l'ordre de 75kDa observée au niveau du puit P de la souche non-mutée promGal:Dbp4 et du puit P de la souche mutante indique clairement une interaction entre Dbp4 et Bfr2. On observe également des bandes non-spécifiques qui correspondent aux chaînes lourdes et légères des anticorps utilisés pour l'IP (anti-HA), puisque l'anti-GFP a été généré dans le même animal (souris). La souche YPH499 est une souche parentale qui n'exprime pas Bfr2::GFP (contrôle négatif de l'immunobuvardage). M, échelle de poids moléculaires des standards de protéines.

protéines Dbp4::HA, le vert (anti-CBF5) permet de détecter le nucléole, et le bleu (DAPI) permet de détecter l'ADN nucléaire.

La souche promGAL1:Dbp4 a servi de contrôle positif (Figure 3.6) et on observe pour la Dbp4 fonctionnelle une localisation normale dans le nucléole, qui est partiellement séparée de l'ADN nucléaire coloré au DAPI. On distingue clairement (flèche) la forme de croissant qui est la forme caractéristique du nucléole au microscope et qui prouve la séparation des deux compartiments (nucléole et ADN nucléaire). Le mutant non-fonctionnel de Dbp4 n'est pas localisé dans le nucléole mais probablement dans le nucléoplasme. En effet, on n'observe plus de séparation entre l'ADN nucléaire et l'ADN nucléolaire.

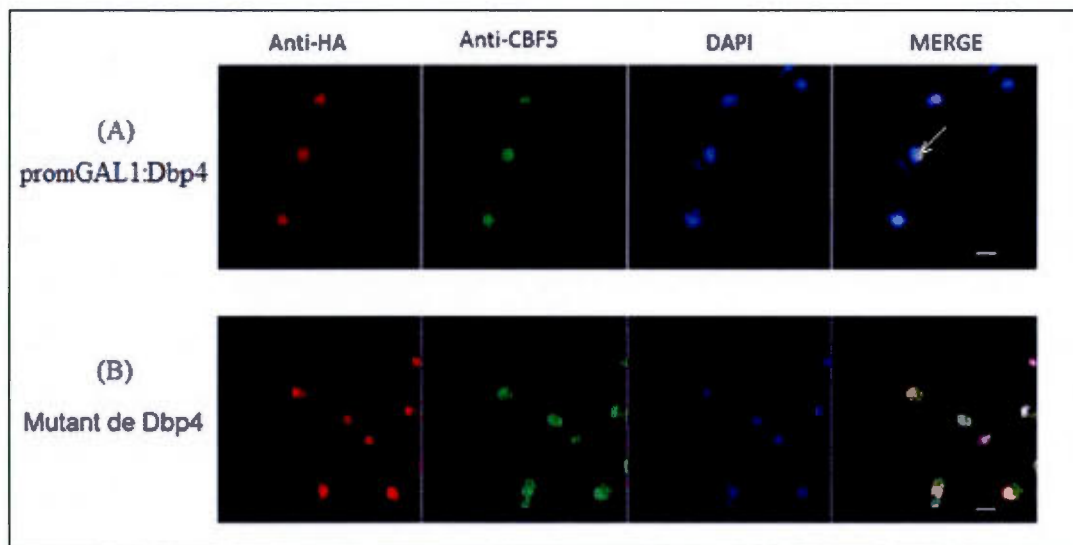


Figure 3.6 Immunolocalisation de Dbp4 fonctionnel et d'un mutant de Dbp4 chez la levure.

Une molécule fluorescente (Alexa Fluor 555) a été couplée à l'anticorps monoclonal anti-HA pour détecter la protéine Dbp4. Un anticorps polyclonal anti-CBF5 a été utilisé pour détecter la protéine CBF5 (protéine nucléolaire). Le DAPI se fixe sur l'ADN nucléaire et émet une fluorescence bleue. (A) Dans le contrôle positif, la souche *promGAL1:Dbp4*, on observe une localisation normale de Dbp4 dans le nucléole. La flèche désigne une forme de croissant caractéristique du nucléole qui indique la séparation partielle entre le nucléole et l'ADN nucléaire coloré au DAPI. (B) Dans un mutant non-fonctionnel de Dbp4, la protéine n'est pas localisée dans le nucléole mais probablement dans le nucléoplasme. En effet, les colorations rouge et bleue sont superposées de façon partielle.

Ces observations laissent entrevoir la possibilité que la mutation non fonctionnelle analysée de la protéine Dbp4 ait causé un défaut de localisation nucléolaire. Si Dbp4 n'arrive plus à accéder au nucléole, il s'ensuit très probablement un mauvais déroulement de la maturation des ARN ribosomiques et un enchaînement incorrect de la biogenèse des ribosomes, ce qui peut causer vraisemblablement un défaut de synthèse protéique.

Un autre point important à mentionner ici affère à la possibilité de réactions faussement positives dues probablement à l'utilisation d'un anticorps polyclonal de lapin anti-CBF5 ("Centromere-Binding Factor 5") qui reconnaît donc plusieurs épitopes de CBF5, ce qui peut causer un marquage plus intense. L'utilisation de

l'anticorps polyclonal anti-CBF5 a engendré un marquage non spécifique, mais aussi une superposition non distincte des couleurs ("merge").

3.5 Effet des mutations sur l'activité de Dbp4 dans la biogenèse des ribosomes par analyse de buvardage de type northern

Étant donné que les résultats précédents ont révélé qu'une mutation non fonctionnelle pourrait causer un défaut de localisation nucléolaire de Dbp4, il en résulte très probablement un défaut de maturation des ARNr et conséquemment un mauvais déroulement de la biogenèse des ribosomes. Nous soupçonnions qu'une mutation non fonctionnelle de Dbp4 entraîne un défaut de synthèse de l'ARNr 18S, qui est impliqué dans l'assemblage de la sous-unité ribosomique 40S. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons opté pour la technique de buvardage de type northern. Nous avons essayé d'analyser l'effet d'une mutation de Dbp4 sur la synthèse et la maturation des pré-ARNr par des expériences de marquage ("[methyl-3H]methionine pulse-chase labeling experiments"). L'absence de bande relative au 18S dans la souche de levure mutante létale nous prouverait que la mutation de Dbp4 altère la synthèse et la maturation de l'ARNr 18S. Toutefois, nos tentatives pour réaliser cette expérience ont échoué. Nous ne sommes pas parvenus à avoir des résultats significatifs. Nous avons rencontré plusieurs problèmes (dégradation de l'ARN, soucis de quantification d'ARN, etc.)

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La synthèse des ribosomes représente l'un des processus les plus importants et les plus complexes qui soient. La résolution de la structure cristallographique du ribosome chez les procaryotes a suggéré que ce dernier pourrait avoir les qualifications d'un ribozyme (Daugeron et al., 2001), notamment dû à ses propriétés catalytiques et à sa capacité à se replier pour former une structure compacte et bien définie. La synthèse des ribosomes représente une activité cellulaire majeure. Une cellule de levure *S. cerevisiae* en pleine croissance peut contenir jusqu'à 200 000 ribosomes, et avec un temps de génération d'environ 90 minutes, elle peut produire plus de 2 000 ribosomes par minute (Daugeron et al., 2001). C'est pour cette raison que les cellules eucaryotes ont développé des mécanismes complexes afin d'assurer la synthèse précise de cette quantité massive de ribosomes.

Les données sur le processus de biogenèse des ribosomes ont été principalement recueillies grâce à une combinaison d'approches de génétique moléculaire et biochimiques chez la levure. Chez *S. cerevisiae*, la grande sous-unité 60S est composée de 46 protéines et de trois espèces d'ARNr (25S, 5.8S et 5S) et la petite sous-unité ribosomique 40S contient 32 protéines et un ARNr 18S. Chez les eucaryotes, la maturation de l'ARNr 18S est régulée par la petite sous-unité (SSU) processome. Cette dernière contient au moins 25 facteurs, dont plusieurs hélicases à ARN (ex. Dbp4) et des protéines liant l'ARN (ex. RRP5 et MRD1) (Turner et al., 2009). Par ailleurs, une déplétion au niveau de Dbp4 entraîne un déficit de la sous-unité ribosomique 40S. Des études ont révélé qu'une déplétion de cette hélicase augmente considérablement le taux de snoARN U14. Dans le même enchaînement d'idées, des mutations ponctuelles dans les motifs I et III de Dbp4 causent un blocage

de synthèse d'U14. Toutes ces observations permettent de conclure que l'activité hélicasique de Dbp4 est nécessaire pour le déroulement normal de la synthèse d'U14 (Kos et Tollervey, 2005). Nombreuses sont les études qui se sont penchées sur les déplétions au niveau des protéines DEAD-box afin de mieux comprendre leurs rôles et leurs fonctions. Dans ce projet de recherche, nous avons utilisé des mutations créées au niveau de la partie C-terminale de Dbp4 afin d'explorer la structure et la fonction de cette hélicase putative et de caractériser son rôle dans le processus de la biogenèse des ribosomes. Dans notre système, l'expression de Dbp4 endogène est dépendante du galactose. Sur milieu galactose, la souche *promGAL1:Dbp4* présente un comportement de croissance similaire à la souche de type sauvage, ce qui permet de démontrer que la souche *promGAL1:Dbp4* est bien fonctionnelle. En présence de dextrose, la survie des cellules dépend d'une protéine Dbp4 fonctionnelle exprimée par un plasmide. Les mutants non-fonctionnels de Dbp4 sur les plasmides vont donc causer la mort des cellules sur milieu dextrose. Les expériences de déplétion (où les souches sont transférées d'un milieu galactose vers un milieu dextrose) ont confirmé que notre système fonctionne comme prévu.

4.1 Position des mutations létales de Dbp4

Malgré que la plupart des processus impliquant les protéines "DEAD-box" chez *S. cerevisiae* ou *E. coli* ont été identifiés, le rôle moléculaire précis de ces protéines reste obscur. Un objectif majeur dans l'avenir serait d'identifier leurs cibles moléculaires et spécialement les facteurs qui interagissent avec ces protéines. L'alignement des séquences de 5 protéines de la famille "DEAD-box" chez *E. coli* montre un cœur catalytique commun flanqué par un domaine C-terminal qui diffère au niveau de la taille (de 70 à 290 acides aminés) et de la séquence. La région catalytique semble contribuer à la liaison non spécifique d'ARN. Chez la levure, les extensions non conservées sont impliquées dans les interactions des protéines

« DEAD-box » avec leurs partenaires. Les parties N-terminales différentes dans leurs séquences, qui sont beaucoup plus courtes comparées à celles des C-terminales. Il n'y a pas encore de rôles spécifiques qui leur soient attribués. Une étude sur DbpA, une protéine « DEAD-box » chez *E. coli*, a montré que le domaine C-terminal est le lieu d'interaction entre les protéines et leurs substrats en activant l'hydrolyse d'ATP (Iost et Dreyfus, 2006). Une autre étude qui tente d'explorer la fonction de la partie C-terminale chez la protéine « DEAD-box » Mss116 de la levure *S. cerevisiae* a dévoilé que ce domaine est capable de soutenir et moduler les activités hélicasiques ou encore les fonctions d'épissage d'ARN (Mohr et al., 2008). De très nombreuses mutations au niveau de la région C-terminale causent des incapacités métaboliques chez la levure telles que l'incapacité de synthétiser certaines molécules ou encore l'incapacité d'utiliser certains sucres comme source de carbone. Une étude a révélé que des mutations dans le gène de DDX10 (l'homologue de Dbp4 chez l'humain) ont été identifiées comme cibles de translocation ou amplification dans les cancers humains (Sjoblom et al., 2006). Dans cette étude, les deux mutations sont localisées dans l'un des deux motifs d'interaction protéine-protéine de type « coiled-coil » au niveau de l'extrémité C-terminale de DDX10.

L'étude de l'effet de mutations peut nous renseigner sur le rôle et la fonction d'une protéine. Une mutagenèse aléatoire mène à une population hétérogène et il est possible à partir de chaque clone de déterminer la ou les mutations d'intérêt. Nous avons ainsi développé un système génétique qui a permis de mettre en évidence les mutants létaux suivis d'une analyse par immunobuvardage afin de détecter les mutants de pleine longueur. La caractérisation de ces mutations devait nous permettre d'éclaircir un peu nos connaissances sur le rôle et la fonction de cette protéine.

Dans notre étude sur les clones létaux de Dbp4, le séquençage de quelques mutants de pleine longueur à multiples mutations a dévoilé qu'une grande majorité des clones

affichent les mêmes mutations. Il est possible que dans ces clones, l'effet d'une mutation soit fortement accentué par la présence d'une seconde (ou plus) mutation et que la létalité liée au clone mutant ne peut avoir lieu que si les mutations sont combinées l'une à l'autre. D'autre part, le séquençage de quelques clones à simple mutation a révélé que la plupart sont réparties tout au long de la région C-terminale de Dbp4 et que certains clones portent une mutation au niveau du domaine « coiled-coil ». Les clones utilisés dans notre étude ont été choisis au hasard, mais en rétrospective, il aurait peut-être été plus judicieux de se concentrer sur les mutations qui ont touché le motif « coiled-coil ». En effet, dans une étude qui s'est penchée sur l'analyse de la fonction de la partie C-terminale chez la protéine « DEAD-box » Mss 116 (impliquée dans l'épissage mitochondrial des introns de groupes I et II, et dans l'activité traductionnelle), les mutations situées dans un motif ayant une structure en hélice α au niveau de la région C-terminale ont fortement inhibé l'activité ATPasique, ce qui a conduit à la fois à une perte de la fonction de la protéine et à un défaut d'épissage de l'ARN (Mohr et al., 2008). Ces résultats suggèrent que cette région en hélice α pourrait stabiliser et / ou réguler l'activité de l'ARN hélicase. En se basant sur ces constatations, nous avons comme objectif d'examiner les clones situés au niveau du motif « coiled-coil ». Pour ce faire, nous pourrions caractériser les activités biochimiques des protéines de type sauvage et mutant, et comparer l'activité ATPase de Dbp4 à l'état sauvage et à l'état muté en présence de concentrations saturantes de différents substrats d'ARN. Nombreux sont les domaines protéiques responsables d'une activité catalytique ou encore de la reconnaissance de certains motifs. Il est très probable que des domaines protéiques tel que le motif « coiled-coil » représenteraient des éléments clefs dans l'accomplissement des fonctions de Dbp4.

4.2 Interaction entre Dbp4 et Bfr2

Étant donné que les ARN hélicases jouent des rôles importants dans des processus nécessitant de gros complexes ARN-protéines, il est probable que Dbp4 agisse en association avec d'autres protéines. Prenons à titre d'exemple l'ARN hélicase eIF4A, dont l'activité hélicasique semble être modulée par la présence de deux partenaires d'interaction, eIF4B et eIF4H (Rogers et al., 2001). Des tests de double hybride chez la levure ont révélé une forte interaction entre Dbp4 et la protéine nucléolaire Bfr2, une protéine essentielle. Tout comme Dbp4, c'est une protéine nucléolaire qui présente deux motifs « coiled-coil ». Il semble que Bfr2 soit nécessaire pour la croissance et la prolifération cellulaire. Lorsque la protéine Bfr2 est surexprimée, la croissance des cellules diminue considérablement. Une inhibition de l'expression de Bfr2 mène également à un arrêt de croissance (Chabane et Kepes, 1998).

Dbp4 est une composante du SSU processome/pré-ribosome 90S et un facteur de synthèse de la sous unité 40S. Il est possible qu'une mutation non fonctionnelle puisse modifier le motif « coiled-coil », ce qui empêcherait les interactions protéine-protéine. Les domaines « coiled-coil » sont souvent capables de réguler les interactions spécifiques sans avoir besoin d'autres domaines protéiques. Les séquences de ces motifs ont la capacité d'interagir avec d'autres séquences « coiled-coil ». Nous avons vérifié les interactions entre un mutant de Dbp4 sélectionnées au hasard et Bfr2. Les résultats relatifs à cette expérience suggèrent que Dbp4 non fonctionnelle continue à interagir avec son partenaire nucléolaire Bfr2, même en présence d'une mutation létale.

Il est possible que le maintien de l'interaction entre Dbp4 et Bfr2 dépende de la présence des protéines qui contrôlent la localisation nucléolaire. En effet, les signaux qui régissent la localisation nucléaire et l'importation des protéines dans le noyau

sont bien caractérisés. Certaines protéines sont capables de pénétrer d'elles-mêmes dans le noyau. Dans ce cas, elles sont dotées d'un signal de localisation nucléaire (NLS) composé d'une séquence d'acides aminés basique. D'autre part, les signaux qui gouvernent la localisation nucléolaire sont encore mal définis, et aucune séquence consensus évidente n'est encore apparue. En plus du NLS, certaines protéines destinées au nucléole sont munies d'une séquence de localisation nucléolaire (NoLS) qui est probablement impliquée dans les interactions entre les molécules nucléolaires. Les NoLS les plus étudiées jusqu'à aujourd'hui concernent les protéines de virus tel que le virus HIV-1 Rev. Une étude a démontré que les protéines munies de NoLS interagissent plus facilement avec d'autres protéines (Sirri et al., 2008). Etant donné que Dbp4 est une protéine nucléolaire et donc dotée d'une NoLS, il est possible que celle-ci permette le maintien de l'interaction entre Dbp4 et son partenaire nucléolaire Bfr2, même dans le cas de mutations létales. Il est aussi possible que l'interaction entre les deux protéines dépende d'autres régions. Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus pour un mutant indiquent que la mutation létale n'affecte pas cette association.

4.3 Localisation sous-cellulaire des mutants de Dbp4

Lorsque le processus de la biogenèse des ribosomes est bloqué, la réorganisation des composants nucléolaires est visible. C'est au niveau de cet organe que les ARNr sont synthétisés, traités et assemblés avec des protéines ribosomiques. Après la mitose, l'assemblage nucléolaire est planifié en temps et en espace par un processus contrôlé par le cycle cellulaire. Il est évident que le nucléole joue un rôle clé dans le processus de maturation des ARNr puisque c'est au sein de cet organe que commencent la synthèse et la maturation des ARNr. Alors que de nombreuses études ont démontré que les protéines localisées au niveau du nucléole peuvent faciliter la synthèse des ARNr, la cartographie du protéome nucléolaire a permis d'identifier plusieurs protéines qui possèdent des fonctions qui ne sont généralement pas

attribuées au processus de la biogenèse des ribosomes (Audas et al., 2012). Ceci suggère que le nucléole peut être multifonctionnel.

Afin d'élucider la fonction cellulaire de Dbp4, nous avons déterminé sa localisation sous-cellulaire. Nos résultats indiquent une localisation normale de Dbp4-3HA dans le nucléole tandis que l'un des mutants non fonctionnels de Dbp4 n'est plus localisé au niveau du nucléole mais dans le nucléoplasme, ce qui conduit probablement à une accumulation de l'ARNr 18S mature dans le cytoplasme puisque c'est au niveau du nucléole que débute la synthèse et la maturation des ARNr. Cette observation pourrait être validée par des analyses de buvardage de type northern. Nos résultats concordent avec la littérature, où une étude sur la protéine « DEAD-box » Dbp9 a permis de prouver, par le même type d'analyse par immunofluorescence, que cette hélicase putative localise principalement au niveau du nucléole (Daugeron et al., 2001).

Dbp4 pourrait être associée avec les corpuscules pré-nucléolaires (« pré-nucleolar bodies », PNB), qui sont considérés comme des structures nucléolaires. Les PNB sont formés à la télophase et disparaissent progressivement pendant la phase G1. Ils constituent également des sites extra-nucléolaires de maturation des pré-ribosomes. Les PNB contiennent des protéines nucléolaires, des snoRNP et des pré-ARNr ribosomiques. Il semble qu'une perte de l'expression des protéines nucléolaires induit un défaut de résolution des particules PNB se traduisant par un défaut des étapes tardives ou précoces de maturation des sous unités 40S et/ou 60S (Carron et al., 2012). Une étude récente a révélé que l'accumulation des particules PNB induit un blocage de la maturation des pré-ARNr. Ce blocage empêche la disparition progressive des PNB en G1, et ces derniers persistent plusieurs heures au niveau du nucléoplasme. Il est probable qu'une perte de l'expression de Dbp4 induise à la fois à un défaut de localisation nucléolaire et à un défaut de résolution des particules PNB,

qui restent piégées au niveau du nucléoplasme. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle Dbp4 mutée persiste dans le nucléoplasme.

Un autre point important à mentionner ici affère à la possibilité de réactions faussement positives due probablement à l'utilisation de l'anticorps polyclonal CBF5 qui a été utilisé dans le but de marquer le nucléole. Ce dernier reconnaît plusieurs épitopes de l'antigène, ce qui peut causer un marquage plus intense. D'autre part, malgré notre choix perspicace de fluorochromes, il était difficile d'éviter un chevauchement de leurs spectres d'émission. Ceci pourrait expliquer les fluorescences artéfactuelles observées. Pour pallier à ces inconvénients, on pourrait sélectionner des fluorochromes ayant des spectres d'émission assez éloignés. Il serait préférable aussi de s'assurer de l'utilisation d'un spectre d'excitation qui soit compatible avec l'équipement (laser et filtres) du microscope disponible. Il faudrait aussi combiner l'anticorps qui donne le plus fort signal à la protéine la moins exprimée. Finalement, l'utilisation d'un anticorps monoclonal permettra de reconnaître un seul épitope de l'antigène et par conséquent le marquage du nucléole sera très spécifique.

4.4 Effet des mutations sur l'activité de Dbp4 dans la biogenèse des ribosomes

Il est devenu évident que de nombreuses hélicases à ARN de la famille à boîte « DEAD » chez la levure *S. cerevisiae* sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes. Diverses études concernent l'effet de déplétion des ARN hélicases putatives sur la maturation des pré-ARNr. Tous les résultats convergent vers une même constatation: la déplétion des protéines « DEAD-box » entraîne des défauts au niveau des sites de clivage qui permettent de séparer les pré-ARNr destinés à la grande et petite sous-unité ribosomique, mais aussi une diminution voire une absence

de synthèse de certains pré-ARNr et conséquemment une altération de la maturation des ARNr, et un déroulement anormal de la biogenèse des ribosomes.

La localisation nucléolaire de Dbp4 plaide en faveur d'une participation de cette protéine dans la biogenèse des ribosomes. Dbp4 participe à la maturation de l'ARNr 18S, donc il est probable qu'une déplétion de cette enzyme nucléolaire cause une forme altérée de l'ARNr 23S, une diminution de la synthèse du précurseur 20S et l'apparition d'une forme aberrante 18S (Daugeron et al., 2001). Nous avons tenté, par la méthode de buvardage de type northern, de définir plus précisément les étapes de maturation des pré-ARNr qui sont affectées au cours de la déplétion de Dbp4. Notre design visait à déterminer le niveau des différentes espèces de pré-ARNr à l'aide d'oligonucléotides hybridant avec les diverses régions du transcrit primaire pré-ARNr 35S. Une accumulation du pré-ARNr 35S indiquerait que les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 sont retardés. De plus, il y aurait parallèlement un niveau moins élevé du précurseur 20S ainsi que de l'ARNr 18S mature. Le niveau du pré-ARNr 27S A2 semble également fortement touché (Daugeron et al., 2001). Nous avons essayé de réaliser cette expérience mais malheureusement toutes nos tentatives ont échoué. Nous ne sommes pas parvenus à avoir des résultats significatifs. Nous avons rencontré des soucis de dégradation de l'ARN, dus probablement à des erreurs techniques de manipulation. En effet, la visualisation de la qualité de l'ARN par migration de l'échantillon sur gel d'agarose a révélé une traînée lors de la migration de l'ARN alors que normalement on est censé observer sur le gel dénaturant deux bandes d'ARN ribosomiques correspondant aux 18S et 28S. Comme la traînée peut aussi résulter de la présence d'ADN dans les échantillons, il serait approprié d'ajouter une étape de digestion par la DNase afin d'éliminer toute trace de cet ADN contaminant. Dans un deuxième temps, nous nous sommes heurtés à des soucis de quantification d'ARN. La quantité d'ARN a été déterminée par la mesure de la DO à 260 nm et il est probable que le dosage ait été faussé par des contaminants tels que les

protéines ou encore les nucléotides libres provenant de l'ARN dégradé. Refaire cette expérience plus proprement et en tenant compte de tous les soucis que nous avons rencontrés semble la solution afin d'aboutir à des résultats significatifs. Nous proposons en outre l'utilisation du système d'analyse « Bioanalyzer 2100 » de la compagnie Agilent. Cet appareil présente l'avantage de combiner la vérification du contrôle qualitatif et quantitatif de l'ARN. Sa principale utilité comprend l'amélioration de la précision des données et de la reproductibilité, mais aussi une consommation minimale d'échantillon. Ce système d'analyse permet de doser avec précision la quantité d'ARN et de discerner immédiatement les échantillons dégradés et contaminés. Toutefois, ce système d'analyse présente l'inconvénient d'être assez coûteux.

Nous anticipons que Dbp4 soit effectivement impliquée dans la maturation des ARNr. Dans des études similaires, il a été montré qu'une déplétion de Dbp9 entraîne une baisse de l'ARNr 18S et une diminution plus drastique de l'ARNr 25S. Un autre fait important est que l'hybridation avec des oligonucléotides situés entre les sites E et C2 a dévoilé une diminution du pré-ARNr 27SB, ce qui explique probablement le déficit net du niveau de la sous-unité ribosomique 60S. Globalement, le déficit observé au niveau de la sous unité 60S est une conséquence de l'altération du précurseur 27S conduisant ainsi à une diminution de l'état d'équilibre de la maturité des ARNr 25S et 5.8S (Daugeron et al., 2001). Des études similaires sur la protéine « DEAD-box » Dbp10p chez la levure *S. cerevisiae* ont indiqué qu'une déplétion de cette hélicase putative entraîne un déficit de synthèse de la sous-unité 60S. Ce déséquilibre induit une diminution du niveau de la synthèse et de la maturation des pré-ARNr matures 7S, 25S et 5.8S (Burger et al., 2000).

L'analyse du profil de polysomes et du contenu en ARN réalisée lors d'une étude sur des cellules de levures déficientes en Dbp9 a permis de révéler un déficit au niveau

des sous-unités 40S et 60S, une diminution globale du ribosome 90S et une accumulation des polysomes (Daugeron et al., 2001). Il serait donc intéressant, pour Dbp4, de comparer les résultats d'immunobuvardage avec ceux des analyses de polysomes. A cet effet, la souche de levure doit être cultivée en milieu YPGal puis déplacée dans un milieu YPD. Les ARN doivent être extraits des cellules récoltées après 16h de déplétion, puis les polysomes séparés sur gradient de sucrose. La caractérisation par analyse spectrophotométrique et immunobuvardage du profil des polysomes permettra de déterminer le contenu en ARN de chacune des fractions du gradient. Tel que mentionné auparavant, Dbp4 est impliquée dans la production de l'ARNr 18S qui entre dans l'assemblage de la sous-unité 40S. L'analyse du profil des polysomes pourrait déterminer si le métabolisme du ribosome est affecté ou pas par une déplétion de Dbp4, ce qui permettra de lui octroyer définitivement un rôle dans la biogenèse des ribosomes de la sous-unité 40S.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

La synthèse des ribosomes est un processus très complexe et constitue une activité cellulaire majeure. La biogenèse de l'ensemble des ribonucléoprotéines nécessite une multitude de facteurs protéiques agissant en *trans*, dont plusieurs hélicases ATP-dépendantes appartenant à la famille « DEAD-box ». A travers ce projet de recherche, nous avons tenté de caractériser chez la levure *S. cerevisiae* la protéine Dbp4 («DEAD-box protein 4») probablement impliquée dans la biogenèse de la sous-unité ribosomique 40S.

Le positionnement des mutations létales au niveau de la partie C-terminale de Dbp4 n'a pas été d'une grande aide dans la compréhension du rôle de la protéine Dbp4 au cours de la biogenèse des ribosomes, qui reste à définir. En effet, une grande majorité des mutations létales étaient réparties tout au long de la partie C-terminale de Dbp4. Nous n'avons encore aucune idée précise des mécanismes moléculaires mis en jeu lorsqu'une déplétion de Dbp4 se produit.

De façon inattendue, des expériences d'interactions protéiques ont dévoilé que l'interaction entre Dbp4 et son partenaire nucléolaire Bfr2 persiste même dans le cas d'une mutation non fonctionnelle. Néanmoins, il serait intéressant de focaliser plus spécifiquement sur les clones portant des mutations létales au niveau du motif d'interaction protéine-protéine situé dans la partie C-terminale de Dbp4. Il est très probable qu'une mutation non fonctionnelle au niveau du domaine « coiled-coil » empêchera l'affinité de Dbp4 pour Bfr2. Dans un deuxième temps, il serait nécessaire de réaliser des analyses bioinformatiques (par exemple de modélisation) sur les régions à l'extérieur de ce domaine. Cela pourrait nous permettre de trouver des pistes pour de futures avenues de recherche.

En accord avec la littérature, nous avons confirmé que Dbp4 est une protéine nucléolaire. Nous avons révélé qu'une mutation non-fonctionnelle de Dbp4 empêche sa localisation au niveau du nucléole, ce qui suggère que Dbp4 soit impliqué dans la maturation de l'ARNr 18S. Cette constatation reste une hypothèse séduisante étant donné le rôle considérable et éminent du nucléole dans le processus de la biogenèse des ribosomes. En effet, c'est au niveau de cet organe que démarre la synthèse et la maturation des ARN ribosomiques, ce qui sous-entend que Dbp4 serait incapable de produire l'ARNr 18S qui est impliqué dans l'assemblage de la sous unité ribosomique 40S, et qu'il en résulterait alors nécessairement un mauvais déroulement de la biogenèse des ribosomes.

L'analyse par buvardage de type northern a été réalisée dans le but de déceler l'effet d'une mutation non fonctionnelle de Dbp4 sur ce processus de synthèse des ribosomes. Malheureusement, cette technique n'a pas été aussi productive que nous l'espérions. Donc, l'hypothèse que cette ARN hélicase Dbp4 soit impliquée dans le processus complexe de la biogenèse des ribosomes reste encore un défi à la fois captivant et passionnant.

Les progrès de la protéomique et des outils de purification par affinité ont largement contribué à l'identification des facteurs impliqués dans les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. Des études chez des organismes multiples pointent principalement vers l'importance des protéines ribosomiques dans l'assemblage du ribosome. Cependant une meilleure compréhension de la complexité et de la variabilité de la biogenèse des ribosomes devrait être mise en place. En effet, tant de questions demeurent sans réponses; il serait intéressant de déterminer quelle est la fonction précise de Dbp4 et pourquoi cette ARN hélicase putative est nécessaire dans le processus de biogenèse des ribosomes. Ainsi, il serait crucial de déterminer les éléments responsables de la spécificité de Dbp4 *in vivo* et *in vitro* mais aussi quels

sont ces ARN cibles ou encore préciser si cette protéine présente une véritable activité hélicasique. Le test classique de l'activité hélicasique consiste à mettre à profit un NTP en utilisant un double brin d'ARN complémentaire mis en présence de la protéine susceptible d'avoir une activité hélicasique. La séparation par électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE permet de distinguer l'ARN simple brin de la structure d'ARN double brin. Si la protéine en question est capable de dissocier le double brin alors la forme simple sera révélée (Eagles et al., 1994).

Il serait bien sûr nécessaire de caractériser tous les mutants non fonctionnels de pleine longueur de Dbp4 obtenus à partir du criblage, tester leur localisation nucléaire, vérifier leurs interactions avec leur partenaire protéique Bfr2 et préciser s'ils présentent ou pas une activité hélicasique. Cette approche globale de caractérisation biochimique pourra sans doute révéler la fonction précise de Dbp4.

La comparaison entre les informations disponibles chez la levure et les cellules de mammifères est d'une importance majeure. Par exemple, la caractérisation de la protéine Dbp4 pourrait éclaircir nos connaissances sur le rôle exact et la fonction précise de son homologue chez l'humain, à savoir la protéine DDX10. Par conséquent, la compréhension des mécanismes liés à l'ARN hélicase Dbp4 serait un enjeu dans la lutte contre certains types de cancer et pourrait même mener à la conception de nouvelles cibles thérapeutiques.

RÉFÉRENCES

- Audas TE, Jacob MD et Lee S. 2012. «Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA». *Molecular Cell* 45: 147-157.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA et Struhl K. 1999. «Short protocols in molecular biology, 4th Edition». Wiley. Mississauga, Canada.
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G et Yusupov M. 2010. «Crystal structure of the eukaryotic ribosome». *Science* 330: 1203-1209.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J et Lamond AI. 2007. «The multifunctional nucleolus». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 574-585.
- Bradley MJ et De La Cruz EM. 2012. «Analyzing ATP utilization by DEAD-Box RNA helicases using kinetic and equilibrium methods». *Methods Enzymol* 511: 29-63.
- Burger F, Daugeron MC et Linder P. 2000. «Dbp10p, a putative RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ribosome biogenesis». *Nucleic Acids Research* 28: 2315-2323.
- Cann KL et Dellaire G. 2010. «Nucleolus as a biomarker in cancer: Past and future». *Canadian Journal of Plant Pathology* 2: 30-34.
- Carron C, Balor S, Delavoie F, Plisson-Chastang C, Faubladier M, Gleizes PE et O'Donohue MF. 2012. «Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing». *Journal of Cell Science* 125: 4532-4542.
- Caruthers JM et McKay DB. 2002. «Helicase structure and mechanism». *Current Opinion in Structural Biology* 12: 123-133.
- Chabane S et Kepes F. 1998. «Expression of the yeast BFR2 gene is regulated at the transcriptional level and through degradation of its product». *Molecular and General Genetics* 258: 215-221.
- Cordin O, Banroques J, Tanner NK et Linder P. 2006. «The DEAD-box protein family of RNA helicases». *Gene* 367: 17-37.

Cretien A, Hurtaud C, Moniz H, Proust A, Marie I, Wagner-Ballon O, Choesmel V, Gleizes PE, Leblanc T, Delaunay J, Tchernia G, Mohandas N et Da Costa L. 2008. «Study of the effects of proteasome inhibitors on ribosomal protein S19 (RPS19) mutants, identified in patients with Diamond-Blackfan anemia». *Haematologica* 93: 1627-1634.

Daugeron MC, Kressler D et Linder P. 2001. «Dbp9p, a putative ATP-dependent RNA helicase involved in 60S-ribosomal-subunit biogenesis, functionally interacts with Dbp6p». *RNA* 7: 1317-1334.

Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlege RE, Shabanowitz J, Osheim Y, Beyer AL, Hunt DF et Baserga SJ. 2002. «A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis». *Nature* 417: 967-970.

Eagles RM, Balmori-Melian E, Beck DL, Gardner RC et Forster RL. 1994. «Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus». *European Journal of Biochemistry* 224: 677-684.

Fairman-Williams ME, Guenther UP et Jankowsky E. 2010. «SF1 and SF2 helicases: family matters». *Current Opinion in Structural Biology* 20: 313-324.

Fields S et Sternglanz R. 1994. «The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions». *Trends in Genetics* 10: 286-292.

Gargantini PR, Serradell MC, Torri A et Lujan HD. 2012. «Putative SF2 helicases of the early-branching eukaryote *Giardia lamblia* are involved in antigenic variation and parasite differentiation into cysts». *BMC Microbiology* 12: 284.

Gerus M, Bonnard C, Caizergues-Ferrer M, Henry Y et Henras AK. 2010. «Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit». *Molecular and Cellular Biology* 30: 1130-1144.

Gruenbaum Y, Raska I et Herrmann H. 2006. «The cell nucleus taking centre stage. Workshop on the functional organization of the cell nucleus». *EMBO Journal* 7: 1211-1215.

Hashem Y, des Georges A, Fu J, Buss SN, Jossinet F, Jobe A, Zhang Q, Liao HY, Grassucci RA, Bajaj C, Westhof E, Madison-Antenucci S et Frank J. 2013. «High-

resolution cryo-electron microscopy structure of the *Trypanosoma brucei* ribosome». *Nature* 494: 385-389.

Hernandez-Verdun D. 2006. «The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions». *Histochemistry and Cell Biology* 126: 135-148.

Iost I et Dreyfus M. 2006. «DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*». *Nucleic Acids Research* 34: 4189-4197.

Johnson ER et McKay DB. 1999. «Crystallographic structure of the amino terminal domain of yeast initiation factor 4A, a representative DEAD-box RNA helicase». *RNA* 5: 1526-1534.

Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M et Ban N. 2012. «Atomic structures of the eukaryotic ribosome». *Trends in Biochemical Sciences* 37: 189-198.

Kos M et Tollervey D. 2005. «The Putative RNA Helicase Dbp4p Is Required for Release of the U14 snoRNA from Preribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*». *Molecular Cell* 20: 53-64.

Kozak M. 1989. «The scanning model for translation: an update». *Journal of Cell Science* 108: 229-241.

Kressler D, Linder P et de La Cruz J. 1999. «Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Molecular and Cellular Biology* 19: 7897-7912.

Kushnirov VV. 2000. «Rapid and reliable protein extraction from yeast». *Yeast* 16: 857-860.

Lemay V, Hossain A, Osheim YN, Beyer AL et Dragon F. 2011. «Identification of novel proteins associated with yeast snR30 small nucleolar RNA». *Nucleic Acids Research* 39: 9659-9670.

Liang WQ, Clark JA et Fournier MJ. 1997. «The rRNA-processing function of the yeast U14 small nucleolar RNA can be rescued by a conserved RNA helicase-like protein». *Molecular and Cellular Biology* 17: 4124-4132.

Liang WQ et Fournier MJ. 1995. «U14 base-pairs with 18S rRNA: a novel snoRNA interaction required for rRNA processing». *Genes and Development* 9: 2433-2443.

Linder P. 2003. «Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation». *Biology of the Cell* 95: 157-167.

Linder P. 2006. «Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling». *Nucleic Acids Research* 34: 4168-4180.

Linder P et Fuller-Pace F. 2013. «Looking back on the birth of DEAD-box RNA helicases». *Biochimica et Biophysica Acta* 1829: 750-755.

Marmier-Gourrier N, Clery A, Schlotter F, Senty-Segault V et Branlant C. 2011. «A second base pair interaction between U3 small nucleolar RNA and the 5'-ETS region is required for early cleavage of the yeast pre-ribosomal RNA». *Nucleic Acids Research* 39: 9731-9745.

Mohr G, Del Campo M, Mohr S, Yang Q, Jia H, Jankowsky E et Lambowitz AM. 2008. «Function of the C-terminal domain of the DEAD-box protein Mss116p analyzed *in vivo* and *in vitro*». *Journal of Molecular Biology* 375: 1344-1364.

Nierhaus KH. 1991. «The assembly of prokaryotic ribosomes». *Biochimie* 73: 739-755.

Olson MO, Dundr M et Szebeni A. 2000. «The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities». *Trends in Cell Biology* 10: 189-196.

Osheim YN, French SL, Keck KM, Champion EA, Spasov K, Dragon F, Baserga SJ et Beyer AL. 2004. «Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*». *Molecular Cell* 16: 943-954.

Owttrim GW. 2006. «RNA helicases and abiotic stress». *Nucleic Acids Research* 34: 3220-3230.

Phipps KR, Charette J et Baserga SJ. 2011. «The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2: 1-21.

Qiu H, Eifert J, Wacheul L, Thiry M, Berger AC, Jakovljevic J, Woolford JL, Jr., Corbett AH, Lafontaine DL, Terns RM et Terns MP. 2008. «Identification of genes that function in the biogenesis and localization of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*». *Molecular and Cellular Biology* 28: 3686-3699.

- Ramakrishnan V. 2002. «Ribosome structure and the mechanism of translation». *Cell* 108: 557-572.
- Reichow SL, Hamma T, Ferre-D'Amare AR et Varani G. 2007. «The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins». *Nucleic Acids Research* 35: 1452-1464.
- Rocak S et Linder P. 2004. «DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism». *Nature Review Molecular Cellular Biology* 5: 232-241.
- Rodriguez-Galan O, Garcia-Gomez JJ et de la Cruz J. 2013. «Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: Current status and perspectives». *Biochimica et Biophysica Acta* 1829: 775-790.
- Rogers GW, Jr., Richter NJ, Lima WF et Merrick WC. 2001. «Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F». *The Journal of Biology Chemistry* 276: 30914-30922.
- Schmidt-Zachmann MS et Nigg EA. 1993. «Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin». *Journal of Cell Science* 105 (Pt 3): 799-806.
- Shiratori A, Shibata T, Arisawa M, Hanaoka F, Murakami Y et Eki T. 1999. «Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis». *Yeast* 15: 219-253.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P et Hernandez-Verdun D. 2008. «Nucleolus: the fascinating nuclear body». *Histochemistry and Cell Biology* 129: 13-31.
- Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW et Velculescu VE. 2006. «The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers». *Science* 314: 268-274.
- Tanner NK. 2003. «The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition». *Cell Cycle* 2: 18-19.

Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doere M et Linder P. 2003. «The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis». *Molecular Cell* 11: 127-138.

Turner AJ, Knox AA, Prieto JL, McStay B et Watkins NJ. 2009. «A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4». *Molecular and Cellular Biology* 29: 3007-3017.

Venema J et Tollervey D. 1999. «Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Annual Review of Genetics* 33: 261-311.

Verschoor A, Warner JR, Srivastava S, Grassucci RA et Frank J. 1998. «Three-dimensional structure of the yeast ribosome». *Nucleic Acids Research* 26: 655-661.

Voet D et Voet J. 2004. «Biochemistry, 3rd Edition». Wiley, Mississauga, Canada.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ et Gay NJ. 1982. «Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold». *EMBO Journal* 1: 945-951.

Walshaw J et Woolfson DN. 2001. «Socket: a program for identifying and analysing coiled-coil motifs within protein structures». *Journal of Molecular Biology* 307: 1427-1450.

Wilson DN et Doudna Cate JH. 2012. «The structure and function of the eukaryotic ribosome». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a011536.

Ye J, Osborne AR, Groll M et Rapoport TA. 2004. «RecA-like motor ATPases--lessons from structures». *Biochimica et Biophysica Acta* 1659: 1-18.